



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 337 424**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97930631 .3**

96 Fecha de presentación : **04.07.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0910633**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.1999**

54 Título: **Gen de poliquétido sintasa I híbrido.**

30 Prioridad: **05.07.1996 GB 9614189**  
**19.08.1996 US 24188 P**  
**28.05.1997 GB 9710962**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.04.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.04.2010**

73 Titular/es: **Biotica Technology Limited**  
**Chesterford Research Park, Little Chesterford**  
**Nr. Saffron Walden, Essex CB10 1XL, GB**

72 Inventor/es: **Leadlay, Peter, Francis;**  
**Staunton, James y**  
**Cortes, Jesus**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

**ES 2 337 424 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Gen de poliquétido sintasa I híbrido.

5 La presente invención se refiere a nuevos poliquétidos y a métodos y medios para prepararlos mediante síntesis recombinante. Se manipulan genes biosintéticos de poliquétido o sus partes, que pueden derivarse de diferentes grupos de genes de poliquétido biosintéticos, para permitir la producción de nuevos poliquétidos híbridos específicos con estructura predeterminada. La invención también se refiere a nuevos sistemas huésped-vector que permiten aumentar los niveles de producción tanto de poliquétidos naturales como artificiales, *in vivo* e *in vitro*.

10 Los poliquétidos son una clase grande y estructuralmente diversa de productos naturales que incluyen muchos compuestos que poseen propiedades antibióticas u otras farmacológicas, tales como eritromicina, tetraciclina, rapamicina, avermectina y FK506. En particular, los poliquétidos son producidos en abundancia por *Streptomyces* y bacterias relacionadas de actinomicetos. Se sintetizan mediante la condensación paso a paso repetida de aciltioesteres de una manera análoga a la de la biosíntesis de ácidos grasos. La mayor diversidad estructural encontrada entre los poliquétidos naturales proviene de la selección (por lo general) de acetato o propionato como unidades “iniciadoras” o “extensibles”; y del grado de diferenciación del procesamiento del grupo D- $\beta$ -ceto observado después de cada condensación. Los ejemplos de etapas de procesamiento incluyen la reducción a D- $\beta$ -hidroxiacil-, reducción seguida de deshidratación a 2-enoil-, y la completa reducción al aciltioester saturado. El resultado estereoquímico de estas etapas de procesamiento también se especifica para cada ciclo de extensión de cadena.

La biosíntesis de poliquétidos se inicia por un grupo de enzimas formadoras de cadena conocidas como las poliquétido sintasas. Se han descrito dos clases de poliquétido sintasas (PKS) en actinomicetos. Una clase, llamada PKS Tipo I, representada por las PKS para la eritromicina, avermectina y rapamicina de macrólidos (Figura 1), consiste en un grupo diferente o “módulo” de enzimas para cada ciclo de extensión de cadena poliquétida (Figura 2) (Cortes, J. *et al. Nature* (1990) **348**:176-178; Donadio, S. *et al. Science* (1991) **252**:675-679; MacNeil, D. J. *et al. Gene* (1992), **115**:119-125; Schwecke, T. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) **92**:7839-7843). Nota: el término “módulo natural”, según se usa en este documento, se refiere al grupo de dominios contiguos, desde un gen de la  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa (“KS”) al siguiente gen de la proteína portadora de acilo (“ACP”), que lleva a cabo un ciclo de extensión de la cadena poliquétida. La expresión “módulo combinatorio” se usa para referirse a cualquier grupo de dominios contiguos (y partes de dominio), que se extienden desde un primer punto en un primer módulo natural, a un segundo punto equivalente en un segundo módulo natural. Los primeros y segundos puntos estarán generalmente en dominios principales que están presentes en todos los módulos, es decir ambos en puntos equivalentes de dominios de la KS, AT (acilo transferasa) o ACP respectiva. La longitud del poliquétido formado se ha modificado, en el caso de la biosíntesis de eritromicina, mediante relocalización específica usando ingeniería genética del dominio enzimático de la PKS productora de eritromicina que contiene la actividad de tioesterasa liberadora de cadena/ciclasa (Cortes, J. *et al. Science* (1995) **268**:1487-1489; Kao, C. M. *et al. J. Am. Chem. Soc.* (1995) **117**:9105-9106)

Se ha demostrado que la eliminación en marco del ADN que codifica parte del dominio de cetoreductasa en el módulo 5 de la PKS productora de eritromicina, (también conocida como la 6-desoxieritronolida B sintasa, DEBS) conduce a la formación de los análogos de eritromicina 5,6-didesoxi-3- $\alpha$ -micarosil-5-oxoeritronolida B, 5,6-didesoxi-5-oxoeritronolida B y 5,6-didesoxi-6,6 $\beta$ -epoxi-5-oxoeritronolida B (Donadio, S. *et al. Science*, (1991) **252**:675-679). Igualmente, la modificación de residuos de sitios activos en el dominio de enoilreductasa del módulo 4 en DEBS, por ingeniería genética del correspondiente ADN que codifica PKS y su introducción en *Saccharopolyspora erythraea*, condujo a la producción de 6,7-anhidroeritromicina C (Donadio S. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) **90**:7119-7123).

La solicitud de patente internacional N°. WO 93/13663 describe otros tipos de manipulación genética de los genes de DEBS que son capaces de producir poliquétidos modificados. Sin embargo, se dice que muchas de tales tentativas han sido improductivas (Hutchinson C. R. y Fujii, I. *Annu. Rev. Microbiol.* (1995) **49**:201-238, en p. 231), y no se ha publicado ningún otro ejemplo de poliquétidos modificados. Se ha descrito la secuencia completa de ADN de los genes de *Streptomyces hygroscopicus* que codifican la PKS Tipo I modular que gobierna la biosíntesis de la rapamicina poliquétida inmunodepresora macrocíclica (Schwecke, T. *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:7839-7843) (Figura 3). La secuencia de ADN está depositada en la Base de Datos del EMBL/Genbank con el número de entrada X86780.

La segunda clase de PKS, llamada PKS Tipo II, está representada por las sintasas para compuestos aromáticos. Las PKS Tipo II contienen sólo un único grupo de actividades enzimáticas para la extensión de cadena y éstos son reutilizados, cuando es apropiado, en ciclos sucesivos (Bibb, M. J. *et al. EMBO J.* (1989) **8**:2727-2736; Sherman, D. H. *et al. EMBO J.* (1989) **8**:2717-2725; Fernández-Moreno, M. A. *et al. J. Biol. Chem.* (1992) **267**:19278-19290). Las unidades “extensibles” para las PKS Tipo II son, por lo general, unidades de acetato, y la presencia de ciclasas específicas dicta la ruta preferida para la ciclación de la cadena completada en un producto aromático (Hutchinson, C. R. y Fujii, I. *Annu. Rev. Microbiol.* (1995) **49**:201-238). Se han obtenido poliquétidos híbridos mediante la introducción de ADN que contiene el gen de PKS Tipo II clonado en otra cepa que contiene un grupo de genes de PKS Tipo II diferente, por ejemplo mediante la introducción del ADN derivado del grupo de genes para actinorrodina, un poliquétido pigmentado de azul de *Streptomyces coelicolor*, en una cepa productora de poliquétido de antraquinona de *Streptomyces galileus* (Bartel, P. L. *et al. J. Bacteriol.* (1990) **172**:4816-4826).

La solicitud de patente internacional N<sup>o</sup>. WO 95/08548 describe el reemplazo de genes de PKS de actinorrodina por ADN heterólogo de otros grupos de PKS Tipo II, para obtener poliquétidos híbridos. La misma solicitud de patente internacional WO 95/08548 describe la construcción de una cepa de *Streptomyces coelicolor* que carece sustancialmente del grupo de genes naturales para la actinorrodina, y el uso en aquella cepa de un vector de plásmido pRM5 derivado del vector de plásmido de número de copia bajo SCP2\* aislado de *Streptomyces coelicolor* (Bibb, M. J. y Hopwood, D. A. *J. Gen. Microbiol.* (1981) **126**:427) y en el que el ADN heterólogo que contiene PKS puede ser expresado bajo el control de la región divergente del promotor act I/act III del grupo de genes de actinorrodina (Fernández-Moreno, M. A. *et al. J. Biol. Chem.* (1992) **267**:19278-19290). El plásmido pRM5 también contiene el ADN del grupo de genes biosintético de actinorrodina que codifica el gen para una proteína activadora específica, Act II-orf4. La proteína Act II-orf4 es requerida para la transcripción de los genes colocados bajo el control del promotor bidireccional de act I/act III y activa la expresión durante la transición del crecimiento a la fase estacionaria en el micelio vegetativo (Hallam, S. E. *et al. Gene* (1988) **74**:305-320).

Se sabe que los grupos de PKS tipo II en *Streptomyces* se activan mediante genes activadores específicos de ruta (Narva, K. E. y Feitelson, J. S. *J. Bacteriol.* (1990) **172**:326-333; Stutzman-Engwall, K. J. *et al. J. Bacteriol.* (1992) **174**:144-154; Fernández-Moreno, M. *et al. Cell* (1991) **66**:769-780; Takano, E. *et al. Mol. Microbiol.* (1992) **7**:837-845; Takano, E. *et al. Mol. Microbiol.* (1992) **6**:2797-2804) cuyo producto génico es requerido para la transcripción de promotores específicos. Se especula que el producto génico de los genes activadores actúa uniéndose a secuencias de ADN específicas en promotores del grupo de genes de PKS en los que el gen activador está localizado (Stutzman-Engwall, K. J. *et al. J. Bacteriol.* (1992) **174**:144-154; Takano, E. *et al. Mol. Microbiol.* (1992) **7**:837-845). El producto génico de DnrI complementa una mutación en el gen de ActII-orf4 de *S. coelicolor*, los que implica que las proteínas de DnrI y ActII-orf4 actúan sobre dianas similares. Se ha descrito un gen (srmR) (documento EP 0 524 832 A2) que está localizado cerca del grupo de genes de PKS Tipo I para el poliquétido de macrólido espiramicina, este gen activa expresamente la producción de la poliquétido de macrólido espiramicina, pero no se ha encontrado ningún otro ejemplo de tal gen. Tampoco se ha descrito ningún homólogo de la familia ActII-orf4/DnrI/RedD de activadores que actúe en los genes de PKS Tipo I.

Aunque se hayan identificado muchos poliquétidos terapéuticamente importantes, queda la necesidad de obtener nuevos poliquétidos que tengan mejores propiedades o posean una bioactividad completamente nueva. Los poliquétidos complejos producidos por las PKS Tipo I modulares son particularmente valiosos porque incluyen compuestos de utilidad conocida como agentes antihelmínticos, insecticidas, inmunodepresores, antifúngicos o antibacterianos. A causa de su complejidad estructural, no se obtienen fácilmente dichos nuevos poliquétidos por síntesis química total, o por modificaciones químicas de los poliquétidos conocidos.

Queda la necesidad de desarrollar modos fiables y específicos para ampliar los módulos individuales en la práctica, de modo que todos los genes de PKS híbrida que se construyan, o una fracción grande de éstos, sean viables y produzcan el producto poliquétido deseado. Esto es particularmente cierto si se desea crear un gran número de grupos de genes de PKS individuales usando los genes de PKS Tipo I modulares de forma manera combinatoria, en la que no será factible analizar a todos los miembros del grupo. Tales bibliotecas de poliquétidos ofrecen una alternativa muy atractiva respecto a la selección aleatoria de muestras de suelo para el descubrimiento de nuevos poliquétidos con valiosas propiedades bioactivas.

Del mismo modo, aunque se hayan descrito combinaciones de huésped-vector específicas que permiten la expresión controlada de genes heterólogos en ciertas *Streptomyces* como, por ejemplo, usando inducción por tioestreptona añadida como se describe para *Streptomyces lividans* 66 y *Streptomyces coelicolor* (Takano, E. *et al. Gene* (1995) **166**:133-137) y utilizando señales alimenticias en el inicio de la diferenciación, como para *Streptomyces coelicolor* en la solicitud de patente internacional N<sup>o</sup>. WO 95/08548, queda una importante necesidad de desarrollar métodos generales para controlar y hasta realizar la expresión de un gen estructural, o de un grupo de genes estructurales, que gobierne la biosíntesis de un metabolito secundario potencialmente valioso, tal como uno de los poliquétidos complejos, en una cepa modificada de *Streptomyces* o de una bacteria filamentosa relacionada.

Un aspecto de la invención proviene de que los inventores han apreciado que un ensamblaje de genes de PKS (particularmente del tipo I) codifica un módulo de carga que es seguido de módulos de extensión. Así, la Figura 2 muestra la organización de los genes de DEBS. El primer marco de lectura abierto codifica la primera multienzima o casete (DEBS1) que consiste en tres módulos: el módulo de carga (*ery*-carga) y dos módulos de extensión (módulos 1 y 2). El módulo de carga comprende una acilo-transferasa y una proteína portadora de acilo. Esto puede ser contrastado con la Figura 1 del documento WO93/13663 (mencionado anteriormente). Este muestra que el ORF1 consiste en sólo dos módulos, el primero de los cuales es, de hecho, tanto el módulo de carga como el primer módulo de extensión.

En consecuencia, la presente invención proporciona, en un primer aspecto, un gen de poliquétido sintasa ("PKS") híbrido que comprende: una primera parte de ácido nucleico o partes que codifican un módulo de carga, y opcionalmente también la cetosintasa (KS) en el principio del primer módulo de extensión siguiente, de una primera PKS tipo I; y una segunda parte de ácido nucleico o partes que codifican al menos un dominio de un módulo de extensión de PKS tipo I de una segunda PKS tipo I, en la que el módulo de carga, y opcionalmente también la cetosintasa (KS) en el principio del primer módulo de extensión siguiente, es de una PKS tipo I diferente a todos los módulos de extensión del gen de PKS híbrida.

## ES 2 337 424 T3

En otro aspecto, la presente invención proporciona un gen de PKS híbrida que comprende una primera parte de ácido nucleico o partes de una primera PKS tipo I, y una segunda parte de ácido nucleico o partes de una segunda PKS tipo I que es diferente de dicha primera PKS en la que dicha primera parte de ácido nucleico o partes codifican un módulo de carga de dicha primera PKS tipo I y opcionalmente el dominio de cetosintasa del primer módulo de extensión de dicha primera PKS tipo I, dicha segunda parte de ácido nucleico o partes codifican al menos un dominio de un módulo de extensión de PKS tipo I de dicha segunda PKS tipo I; y en la que el sitio de corte y empalme entre la primera parte de ácido nucleico y la segunda parte de ácido nucleico está localizado en la región enlazante entre el módulo de carga y el dominio de KS del primer módulo de extensión de la segunda PKS tipo I, en el principio del dominio de KS del primer módulo de extensión de la segunda PKS tipo I, en la región final del dominio de KS del primer módulo de extensión de la primera PKS tipo I o en la región enlazante entre el dominio de KS del primer módulo de extensión de la primera PKS tipo I y el dominio AT del primer módulo de extensión de la segunda PKS tipo I.

En una realización, el módulo de carga puede comprender una aciltransferasa y una proteína portadora de acilo.

En una realización, la primera parte de ácido nucleico o partes codifican el módulo de carga sólo.

En una realización, en la primera PKS tipo I, el módulo de carga es seguido de un módulo de extensión que comienza con un dominio de cetosintasa ("KS"); y la primera parte de ácido nucleico codifica el módulo de carga junto con sólo el dominio de cetosintasa ("KS") del módulo de extensión de la primera PKS.

En una realización, el módulo de carga es capaz de cargar un sustrato para producir una unidad iniciadora diferente de una unidad iniciadora de un poliquétido como se produce por la segunda PKS tipo I.

En una realización, el módulo de carga es capaz de cargar cualquiera de una multiplicidad de unidades iniciadoras diferentes.

En una realización, el módulo de carga es un módulo de carga de avr.

En una realización, el módulo de carga es un módulo de carga de rap.

En una realización, el módulo de carga es un módulo de carga productor de FK506.

En una realización, al menos una de las partes de ácido nucleico codifica un módulo combinatorio, a saber una parte de ácido nucleico que se extiende en la primera o segunda PKS tipo I entre dominios correspondientes de dos módulos naturales.

En una realización, el gen de PKS híbrida incluye ácido nucleico que codifica una enzima terminadora de cadena distinta a la tioesterasa.

En una realización, el ácido nucleico que codifica el gen de PKS híbrida está operativamente unido a un promotor de PKS tipo II.

En una realización, el ácido nucleico que codifica el gen de PKS híbrida operativamente unido a un promotor de PKS tipo II está acompañado por su gen activador natural.

En una realización, el promotor de PKS tipo II, promotor operativamente unido al ácido nucleico que codifica el gen de PKS híbrida, es act I de *S. coelicolor*.

En una realización, el act I del promotor r de *S. coelicolor* está acompañado por el activador de actII-ort4 de *S. coelicolor*.

En una realización, se proporciona una poliquétido sintasa híbrida como se codifica por el ácido nucleico que codifica el gen de PKS híbrida expuesto antes.

En una realización, se proporciona un vector que incluye el ácido nucleico que codifica el gen de PKS híbrida expuesto antes.

En una realización, se proporciona una bacteria filamentosa transformada que contiene el ácido nucleico que codifica el gen de PKS híbrida expuesto antes y capaz de expresar una poliquétido sintasa codificada por éste.

En una realización, se proporciona un método para producir una bacteria filamentosa transformada como se define anteriormente en el que el método comprende la etapa de introducir un plásmido que contiene el ADN "donante" en una célula huésped en condiciones tal que hay recombinación homóloga con el ADN de PKS cromosómico heterólogo.

En una realización, se proporciona un método para preparar un poliquétido cultivando la bacteria filamentosa como se define anteriormente.

## ES 2 337 424 T3

Se describe en este documento la producción de un ensamblaje de genes de PKS híbrido que comprende un módulo de carga y al menos un, y preferiblemente varios, módulos de extensión ensamblando juntos una primera parte de ácido nucleico o partes que codifican al menos un dominio de una primera PKS tipo I con una segunda parte de ácido nucleico o partes que codifican al menos un dominio de PKS tipo I que es heterólogo a dicha primera PKS. Generalmente, los ácidos nucleicos son ADN. Las primeras y segundas partes pueden codificar cada una el(los) dominio(s) de las diferentes PKS respectivas.

Preferiblemente, la PKS híbrida codifica un módulo de carga y de 1 a 6 módulos de extensión dentro de cualquier casete dado. Más preferiblemente, hay al menos 2 módulos de extensión. NB: los productos que resultan de muchos más de 6 módulos pueden originarse de ensamblajes de sintasas (c.f. rapamicina).

La primera parte puede codificar un módulo de carga, mientras que la segunda parte codifica uno o varios módulos de extensión. O bien, la(s) primera(s) parte(s) puede(n) codificar todo o parte de un módulo de carga, los dos primeros módulos de extensión, y una enzima terminadora de cadena (generalmente una tioesterasa), p.ej de PKS de eritromicina, y la(s) segunda(s) parte(s) corresponde(n) a uno o varios dominios y/o módulos de una PKS diferente.

Es particularmente útil proporcionar un ensamblaje de genes de PKS híbrido en el que el módulo de carga sea heterólogo respecto a los módulos de extensión y sea tal que conduzca a un poliquétido con una unidad iniciadora modificada. Nota: Este es un concepto completamente desconocido en la técnica anterior ya que éste no reconoce la existencia de módulos de carga. El documento W093/13663 se refiere a la modificación de genes de PKS desactivando una función sola (es decir, una enzima sola) o afectando a "un módulo entero" por delección, introducción o reemplazo de éste. Pero en sus términos, el ensamblaje de carga no es un módulo. Si el módulo de carga es el que acepta muchas unidades diferentes de ácido carboxílico entonces el ensamblaje de genes híbrido puede usarse para producir muchos poliquétidos diferentes. Por ejemplo, un ensamblaje de genes híbrido puede emplear el ácido nucleico que codifica un módulo de carga de *avr* con módulos extensores de *ery*. Un módulo de carga puede aceptar unidades de ácido no naturales. O bien, o además, se puede cambiar el extremo de un ensamblaje de genes.

Por lo tanto, la enzima terminadora de cadena normal de una PKS (por lo general la tioesterasa) puede ser sustituida por una enzima que conduzca a un tipo diferente de producto. Consecuentemente, puede hacerse uso de la enzima del sistema de rapamicina que conecta la cadena poliquétida a una cadena de aminoácidos. Esto puede usarse para sintetizar combinaciones de polipéptido/poliquétido, p.ej para producir derivados de D- $\beta$ -lactama.

Por supuesto, se pueden hacer modificaciones dentro de un producto poliquétido, particularmente sustituyendo un módulo de extensión por uno que dé una unidad de quietida en un estado de oxidación diferente y/o con una estereoquímica diferente. Nota: se asumía de forma general que la estereoquímica de los grupos metilo en la cadena poliquétida estaba determinada por la aciltransferasa. Pero esto es, de hecho, un rasgo de otros dominios de la PKS, y por eso se abre a la variación sólo por el reemplazo de aquellos dominios, individualmente o por el reemplazo de un módulo. Pueden añadirse o eliminarse el metilo y otros sustituyentes mediante reemplazo del dominio de aciltransferasa o reemplazo del módulo total.

Este aspecto de la invención se ocupa, en gran parte, del tratamiento de módulos de gen de PKS como componentes básicos que pueden usarse para construir sistemas enzimáticos, y por consiguiente productos poliquétidos, de los tipos deseados. Esto generalmente implica el recorte y el ensamblaje de agrupaciones multimodulares y modulares. Podría asumirse que los sitios correctos para hacer y romper uniones intermodulares estarían en las regiones de unión entre módulos, donde con experimentos anteriormente publicados por los inventores usando proteolisis limitada se ha demostrado que dichos enlaces están en la superficie de la proteína (Aparicio, J. F. *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* **269**:8524-8528; Staunton, J. *et al.* (1996) *Nature Structural Biol.* **3**:188-192). Sin embargo, los inventores han encontrado que puede ser preferible hacer cortes y uniones realmente dentro de los dominios (es decir, en las partes que codifican enzimas), cerca de sus bordes. El ADN está muy conservado allí entre todas las PKS modulares, y esto puede ayudar a la construcción de híbridos que pueden ser transcritos. Esto también ayuda al mantenimiento del espaciado de los sitios activos de las enzimas codificadas, lo que puede ser importante. Por ejemplo, en la producción de un gen híbrido sustituyendo el módulo de carga *ery* por un módulo de carga *avr*, se elimina el módulo de *ery* junto con una pequeña cantidad del dominio de cetosintasa siguiente (KS). El principio del dominio de KS (bien espaciado del sitio activo) está muy conservado y por lo tanto proporciona un sitio de corte y empalme alternativo al sitio obvio en la región enlazante entre el módulo de carga y dominio de KS. El módulo de *ery* escindido fue sustituido entonces por un módulo de carga de *avr*.

De hecho, cuando se sustituye un módulo de carga, puede ser deseable sustituir no sólo los dominios del módulo de carga (generalmente, la acil-transferasa (AT) y la proteína portadora de acilo (ACP)) sino también la KS en el principio del módulo de extensión siguiente. Típicamente, el módulo de carga escindido habría proporcionado un iniciador de propionato, y se requiere el reemplazo para proporcionar uno o varios iniciadores diferentes. Pero el propionato puede alimentarse en la KS del módulo de extensión a partir de una reserva de propionato en la célula huésped, conduciendo a la dilución de los productos deseados. Esto puede ser, en gran parte, prevenido sustituyendo un módulo de carga ampliado que incluya todos o la mayor parte del dominio de KS. (El sitio de empalme puede estar en la región del extremo del gen de KS, o adelantado en el siguiente gen AT, o en la región enlazante entre los dominios de KS y AT.) Cuando se sustituyen los "módulos", los inventores no se restringen a la cuestión de los módulos "naturales". Por ejemplo un "módulo combinatorio" que se escinde y/o se sustituye y/o se inserta puede extenderse desde el dominio correspondiente de dos módulos de tipo natural, p.ej desde el AT de un módulo al AT del siguiente, o desde KS a

## ES 2 337 424 T3

KS. Los sitios de empalme estarán en regiones marginales conservadas correspondientes, o en regiones enlazantes entre dominios cerca de sitios conocidos para la proteólisis limitada. Un módulo combinatorio también puede ser un múltiplo “doble” o más grande, para añadir 2 o más módulos a la vez. También se describen en este documento ensamblajes de genes como se detallan anteriormente, vectores que contienen tales ensamblajes de genes y organismos transformantes que pueden expresarlos. Los organismos transformantes pueden albergar plásmidos recombinantes, o los plásmidos pueden integrarse. Un plásmido con una secuencia int se integrará en un sitio de unión específico (*att*) de un cromosoma de un huésped. Los organismos transformantes pueden ser capaces de modificar los productos iniciales, p.ej realizando todas o algunas de las modificaciones biosintéticas normales en la producción de eritromicinas (como se muestra en la Figura 2B) y/o otros poliquétidos. Puede hacerse uso de organismos mutantes tal que algunas de las rutas normales sean bloqueados, p.ej para producir productos sin ninguno o algunos grupos hidroxilo “naturales” o grupos de azúcar. La invención proporciona además nuevos poliquétidos producibles, directamente o indirectamente, por organismos transformantes. (Esto incluye poliquétidos que se han sometido a una modificación enzimática en los organismos y/o que se han aislado y sometido a modificación química.)

En otro aspecto, la invención proporciona un ensamblaje de genes híbrido que comprende componentes génicos estructurales operativamente unidos a un promotor que no está naturalmente unido a éste y es de una PKS tipo II, preferiblemente unidos a su gen activador cognado específico. Es particularmente preferido el uso del promotor *act I* y el gen activador de *Act II-orf4* de *S. coelicolor*, para la expresión en huéspedes distintos de *S. coelicolor* (por lo general otros actinomicetos, particularmente otros estreptomicetos). Los componentes de genes estructurales pueden ser de un sistema de genes de PKS tipo I.

La invención, en este otro aspecto, proporciona vectores que contienen tales ensamblajes de genes, y organismos transformantes que pueden expresarlos. Es posible combinar los dos aspectos de la invención, de modo que sea expresado un gen tipo I híbrido bajo el control de un promotor tipo II.

Se describen en este documento nuevos poliquétidos asequibles por medio de los aspectos anteriores. Éstas incluyen las siguientes.

(i) Un análogo de eritromicina (que es un compuesto macrólido con un anillo de 14 miembros) en el que el C-13 lleva una cadena secundaria distinta de etilo, generalmente un grupo alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> O-ramificado, un grupo cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> o cicloalqueno (opcionalmente sustituido, p.ej, con uno o varios hidroxilo, grupos alquilo C<sub>1-4</sub> o alcoxi o átomos de halógeno), o un heterociclo de 3-6 miembros que contiene O o S, saturado o totalmente o parcialmente insaturado, opcionalmente sustituido (en cuanto al cicloalquilo). Los candidatos preferidos para el sustituyente de C-13 R son los grupos de unidades de carboxilato R. CO-O-utilizables como sustratos por un módulo iniciador de avr, o variantes de iniciador de rapamicina. Los sustratos preferidos incluyen isobutirato (R=i-Pr) y 2-metilbutirato (R=1-metilpropilo). Otras posibilidades incluyen n-butirato, carboxilato de ciclohexilo, carboxilato de cicloheptanilo, carboxilatos de ciclohexenilo, carboxilatos de cicloheptenilo y variantes metiladas de anillo de los carboxilatos cíclicos. El análogo de eritromicina puede corresponder al producto inicial de una PKS (6-desoxieritronolida) o el producto después de una o varias de las etapas biosintéticas normales. Como se muestra en la Figura 2B, éstos comprenden: 6-hidroxilación; 3-0-glicosilación; 5-0-glicosilación; 12-hidroxilación; y metilación de azúcar específica.

Por lo tanto, los análogos incluyen los correspondientes a 6-desoxieritronolida B, eritromicina A, y los diversos intermedios y alternativas mostradas en la Figura 2B.

Además o de forma alternativa, puede haber modificación química. Por ejemplo, pueden oxidarse uno o varios grupos hidroxilo (p.ej para producir derivados 3-ceto) o eliminarse (p.ej para producir derivados de 10-eno). Algunos ejemplos de modificaciones químicas aplicables a los poliquétidos producidos de acuerdo con la presente invención son aquellos que dan lugar a azitromicina, roxitromicina, claritromicina y aquellos descritos en algunas patentes francesas de Roussel Uclaf: 2697523, 2697524 y 2702480.

(ii) análogos de eritromicina que se diferencian del compuesto “natural” correspondiente (Figura 2a) en el estado de oxidación de una o varias de las unidades de quietida (es decir, selección de alternativas del grupo: -CO-, -CH(OH)-, =CH-, y -CH<sub>2</sub>-). La estereoquímica de cualquier -CH(OH)- es también independientemente seleccionable.

(iii) análogos de eritromicina que se diferencian del compuesto “natural” correspondiente por la ausencia de una cadena secundaria de metilo “natural”. (Este es alcanzable por el uso de una variante AT). Los módulos de extensión normales usan unidades C<sub>2</sub> o C<sub>3</sub> para proporcionar unidades de quietida no metiladas y metiladas. Se pueden proporcionar unidades no metiladas donde las unidades metiladas son naturales (y viceversa, en sistemas en los que hay unidades naturalmente no metiladas) y también se pueden proporcionar unidades más grandes, p.ej. C<sub>4</sub> para proporcionar sustituyentes de etilo.

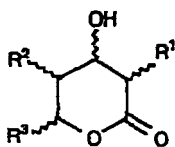
(iv) análogos de eritromicina que se diferencian del compuesto “natural” correspondiente en la estereoquímica del metilo “natural”; y/o sustituyentes de anillo distintos de metilo.

(v) análogos de eritromicina que tienen las características de dos o más de las secciones (i) a (iv);

## ES 2 337 424 T3

(vi) análogos de triquetida lactona (“TKL”):

5



10

(I)

15

R<sub>3</sub> es la cadena secundaria derivada de la unidad iniciadora, y se somete a la variación descrita para la cadena secundaria C-13 descrita anteriormente en (i).

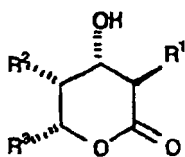
20

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son “naturalmente” metilo, pero tanto uno como ambos pueden ser sustituidos por hidrógeno o etilo (usando unidades extensibles que emplean butirato).

25

La estereoquímica natural es:

30



35

(II)

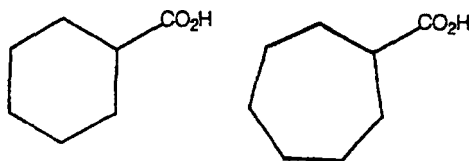
40

pero alguno o dos o todos de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y OH pueden tener la estereoquímica opuesta. Generalmente, los análogos de TKL pueden tener variaciones como se describe para eritromicinas en los (i) a (v) anteriores.

45

(vi) poliquétidos de otros tipos de eritromicina, p.ej rapamicina o avermectina, que tienen modificaciones correspondientes a las descritas en las secciones de (i) a (v). Por ejemplo, los inventores han producido variantes de rapamicina usándolas como ácidos iniciadores añadidos:

50



55

viii) versiones truncadas o ampliadas de cadenas poliquétidas:

60

- diquetidas R<sup>1</sup>-CHOH-CHR<sup>2</sup>-CO<sub>2</sub>H
- triquetidas R<sup>1</sup>-CHOH-CHR<sup>2</sup>-CHOH-CHR<sup>3</sup>-CO<sub>2</sub>H
- tetraquetidas R<sup>1</sup>-CHOH-CHR<sup>2</sup>-CHOH-CHR<sup>3</sup>-CHOH-CHR<sup>4</sup>-CO<sub>2</sub>H
- penta-, hexa-, hepta-cadenas de quetida y más grandes.

65

Las cadenas pueden tener variantes como se describe en de (i) a (iv).

ix) fusiones de quetida/no quetida.

## ES 2 337 424 T3

La rapamicina es un ejemplo natural de una fusión de poliquétido/péptido. Pueden emplearse medios tales como una enzima que incorpora péptidos para crear poliquétidos fusionados a uno o varios aminoácidos.

x) Poliquétidos (o fusiones) ciclados por formación de lactonas, hemicetales, cetales, lactamas o lactoles.

xi) derivados de cualquiera de los anteriores que se han sometido a un procesamiento adicional por enzimas que no son PKS, por ej. una o varias de hidroxilación, epoxidación, glicosilación y metilación.

La presente invención proporciona un método para obtener nuevos poliquétidos complejos; y nuevos métodos para aumentar la producción tanto de poliquétidos nuevos como de los conocidos.

Por consiguiente, en un tipo de realización de la invención, se han usado uno o varios segmentos de ADN que codifican módulos individuales o dominios dentro de una PKS Tipo I natural (la PKS “donante”) para sustituir el ADN que codifica, respectivamente, módulos individuales o dominios de otra PKS Tipo I natural (la PKS “aceptadora”). El número total de módulos de extensión reunidos en la PKS híbrida no es fijo, pero el número preferido de tales módulos en cualquier multienzima o casete varía entre uno, creando la PKS funcional lo más pequeña posible, y seis, que iguala el número más grande de módulos consecutivos encontrados hasta ahora que se alojan en una sola multienzima de una PKS Tipo I natural, denominada la PKS de rap de *Streptomyces hygroscopicus*. Con el fin de definir qué genes de PKS híbrida serán viables y productivos, el ADN de la PKS aceptadora consiste en, o está comprendido por, el módulo de carga, primeros dos módulos de extensión y tioesterasa terminadora de cadena de la PKS de ery, u otra PKS, preferiblemente natural, tipo I, alojada en un vector de plásmido adecuado. Se sustituyen expresamente uno o varios dominios individuales, o uno o varios módulos individuales, por el ADN que codifica dominios análogos o módulos y se derivan de una PKS Tipo I natural diferente (la PKS “donante”).

La secuencia de ADN modificada se introduce en un microorganismo adecuado y el microorganismo genéticamente modificado se cultiva en condiciones adecuadas para la producción del poliquétido.

Sorprendentemente y de improviso, cuando se cultivan estos microorganismos genéticamente modificados en condiciones adecuadas se encuentra que producen análogos artificiales del(de los) producto(s) poliquétido(s) de la PKS aceptadora natural, y cuando es apropiado se encuentra que los productos sufren el mismo proceso que el poliquétido natural.

En este aspecto de la invención, el vector del plásmido puede ser cualquiera escogido de una larga lista de vectores de plásmido conocidos por ser útiles para clonar en *Streptomyces* y bacterias Gram positivo relacionadas. Se ha encontrado que es particularmente útil seleccionar un vector de plásmido de número de copia bajo con un amplio rango de huéspedes según el plásmido SCP2\* de *Streptomyces coelicolor* M110. Se describe en este documento la construcción de dos plásmidos derivados de SCP2\* particularmente adecuados para este fin. Un plásmido precursor en la construcción de uno de estos dos plásmidos, que carezca de un origen de replicación de estreptomiceto pero que, por otra parte, tenga las mismas características, es también particularmente adecuado. Es conocido en la técnica que la integración por recombinación homóloga puede ser conseguida usando los llamados vectores suicidas, que sólo tienen un origen de replicación activo en *Escherichia coli*, en actinomicetos (“Stimulation of erythromycin yield by integration of a chromosomal DNA fragment including the eryCI gene into the chromosome of *S. erythraea*”, Hanel, F. *et al. Biotechnology Letters* (1993) **15**:105-110; “Insertion of plasmids into the chromosome of *Streptomyces griseofuscus*”, Larson, J. L. and Hershberger, C. L. *Plasmid* (1990) **23**:252-256; véase también: “Denaturation of circular or linear DNA facilitates integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): possible relevance to other organisms”, Oh, S. H. y Chater, K. F. (1997) *J. Bacteriol* **179**:122-127). Los triquetida lactona sintasa de la PKS “aceptadora” puede estar formada por módulos de carga, módulos de extensión y actividades terminadoras de cadena presentadas por cualquier PKS Tipo I natural o artificial, pero son particularmente adecuados para este fin los componentes de las PKS tipo I para la biosíntesis de eritromicina, rapamicina, avermectina, tetronasina, oleandomicina, monensina, anfotericina y rifamicina, para todos los cuales la organización de genes y modular es conocida por el análisis de secuencia de genes, al menos en parte. Los ejemplos particularmente favorables de los módulos de carga de la PKS donante son aquellos módulos de carga que muestran una especificidad relajada, por ejemplo el módulo de carga de la PKS productora de avermectina (avr) de *Streptomyces avermitilis*; o aquellos módulos de carga que poseen una especificidad extraña, por ejemplo los módulos de carga de las PKS que producen rapamicina, FK506 y ascomicina, todos los cuales aceptan naturalmente una unidad iniciadora derivada de shikimate.

Las células genéticamente modificadas adecuadas para la expresión de los genes de PKS Tipo I híbrida pueden ser obtenidas a partir de algunos actinomicetos capaces de mantener el vector en una forma autónoma o integrada. Los huéspedes particularmente eficaces son *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces cinnamonensis*, *Micromonospora griseorubida*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces longisporoflavus*, *Streptomyces lasaliensis*, *Streptomyces tsukubaensis*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces rimosus* y *Streptomyces albus*. Éstos incluyen a huéspedes en los cuales se sabe que los vectores del plásmido derivados de SCP2\* se clonan autónomamente, como, por ejemplo, *S. coelicolor*, *S. avermitilis* y *S. griseofuscus*; y otros huéspedes tales como *Saccharopolyspora erythraea* en los que los plásmidos derivados de SCP2\* se vuelven integrados en el cromosoma por recombinación homóloga entre secuencias en el inserto del plásmido y sobre el cromosoma; y todos los huéspedes que están íntegramente transformados por vectores de plásmido suicidas.

En un aspecto más de la presente invención, se introduce un plásmido que contiene el ADN de PKS “donante” en una célula huésped bajo condiciones en las que el plásmido se vuelve integrado en genes de la PKS aceptadora en el cromosoma bacteriano por recombinación homóloga, para crear una PKS híbrida. Una realización preferida es cuando el ADN de la PKS donante incluye un segmento que codifica un módulo de carga, de tal modo que este módulo de carga se vuelve unido a los genes de la PKS aceptadora en el cromosoma. Dicha PKS híbrida produce productos poliquétidos híbridos valiosos y nuevos cuando se cultivan bajo las condiciones adecuadas como se describe en este documento. Expresamente, cuando el módulo de carga de la PKS aceptadora es sustituido por el módulo de carga de la PKS productora de avermectina (avr), los productos poliquétidos híbridos contienen una unidad iniciadora típica de las usadas por la PKS de avr. Así, cuando el módulo de carga de la PKS de ery es sustituido por el módulo de carga de avr, se encuentra que las cepas de *Saccharopolyspora erythraea* que contienen tal PKS híbrida producen macrólidos de 14 miembros que contienen unidades iniciadoras típicamente usadas por la PKS de avr.

Es muy sorprendente e inesperado que se haya encontrado que los poliquétidos de macrólido de 14 miembros producidos por tales células recombinantes de *S. erythraea* incluyan derivados de eritromicina A, mostrando que se realizan correctamente las diversas etapas de proceso requeridas para la transformación de los productos de la PKS híbrida en nuevos, y terapéuticamente valiosos, derivados de eritromicina.

Un aspecto más de la presente invención es el descubrimiento inesperado y sorprendente de que la transcripción de cualquiera de los genes de PKS Tipo I híbrida, cuya construcción es descrita en este documento, puede ser expresamente aumentada cuando los genes híbridos son colocados bajo el control de un promotor para un gen de PKS Tipo II unido a un gen activador específico para aquel promotor. Es particularmente notable que cuando se cultiva una célula genéticamente modificada que contiene los genes tipo I híbridos bajo tal control en las condiciones adecuadas para la producción de poliquétidos, se producen niveles sustancialmente mayores del poliquétido híbrido. Tales aumentos específicos del rendimiento de un producto poliquétido valioso también se observan para los poliquétidos naturales producidos por una PKS Tipo I colocada bajo el control de un promotor de PKS Tipo II y el gen activador. En una realización preferida, se colocan genes de PKS tipo I presentes en un plásmido derivado de SCP2\* o un plásmido precursor que carece sólo del origen de replicación de estreptomyceto, bajo el control del promotor de actI derivado del grupo de genes biosintético de actinorrodina de *Streptomyces coelicolor*, y en el que el vector también contiene el gen estructural que codifica la proteína activadora específica Act II-orf 4. El plásmido recombinante se introduce en huéspedes bacterianos distintos de la *Streptomyces coelicolor* elegida de los géneros *Streptomyces* y relacionados, bajo condiciones en las cuales los genes de PKS introducidos, o genes de PKS ya presentes en la cepa huésped, son expresados bajo el control del promotor de actI.

Las cepas recombinantes producen el producto poliquétido específico deseado y el gen activador requiere sólo la presencia del promotor específico a fin de realzar la eficacia transcripcional del promotor. Esto es particularmente sorprendente porque los activadores de la familia ActII-orf4 no pertenecen a una clase reconocida de proteínas de unión de ADN. Por lo tanto, sería esperable que otras proteínas u otros elementos de control fueran requeridos para que la activación ocurriera en un huésped heterólogo no conocido para producir actinorrodina o un pigmento de isocromanoquinona relacionado. Es también sorprendente y útil que las cepas recombinantes producen hasta 10 veces de producto poliquétido más específico que cuando los mismos genes de PKS están bajo el control del promotor natural, y el producto poliquétido específico también se produce precozmente en el cultivo creciente, en vez de sólo durante la transición del crecimiento a la fase inmóvil. Tales poliquétidos son útiles como antibióticos, agentes anticáncer, inmunodepresores y para muchos otros fines en medicina humana y veterinaria.

Cuando la célula genéticamente modificada es *Saccharopolyspora erythraea*, el activador y el promotor se derivan del grupo de genes de PKS de actinorrodina y el grupo de genes de PKS de ery regulado por actI/actII-orf4 se aloja en el cromosoma, después de la integración específica del sitio de un vector del plásmido, el cultivo de estas células en condiciones adecuadas produce hasta diez veces más producto macrólido de 14 miembros total que en una cepa comparable que no está bajo tal control heterólogo. Cuando en dicha célula genéticamente modificada de *S. erythraea*, los genes de PKS bajo este control heterólogo son genes de PKS Tipo I híbrida cuya construcción es la descrita en este documento, entonces se obtienen de nuevo hasta diez veces más producto poliquétido híbrido comparado con los mismos genes de PKS Tipo I híbrida, no bajo dicho control. Expresamente, cuando los genes de PKS Tipo I híbrida son los genes de PKS de ery en los cuales el módulo de carga está sustituido por el módulo de carga de avr, se encuentra un aumento de diez veces en las cantidades totales de nuevos macrólidos de 14 miembros producidos por las células genéticamente modificadas cuando se cultivan bajo las condiciones adecuadas como se describe en este documento. Se ha descrito la capacidad de que una poliquétido sintasa modular funcione en un sistema sin células, para el sistema de DEBS1-TE de *Saccharopolyspora erythraea* (Leadlay, P. F. Presentación del 9<sup>a</sup> Simposio Internacional de la Biología de Actinomicetos, Moscú, 10-15 de julio (1994) S7-2; Wiesmann, K. E. *et al.* Presentación del póster P2-02, p. 154, Resúmenes del 9<sup>a</sup> Simposio Internacional de la Biología de Actinomicetos, Moscú, 10-15 de julio (1994); Wiesmann, K. E. *et al.* (1995) *Chem. and Biol.* 2:583-589) y para la producción de 6-desoxieritronolida B por DEBS1, DEBS2 y DEBS3 (Pieper *et al.* (1995) *Nature* 378:263266). En consecuencia, la sorprendente e inesperada capacidad del gen de actII-orf4 activa al promotor de actI en *S. erythraea* y, para hacerlo con más eficacia que en su cepa de huésped natural, conduce naturalmente a un aumento impresionante y valioso correspondiente en una cantidad de enzimas de DEBS activas producidas por las cepas de *S. erythraea* recombinantes que se describe en este documento.

Los medios adecuados y preferidos para cultivar las células genéticamente modificadas, y los medios preferidos de aislamiento tanto de poliquétidos naturales como híbridos se describen más ampliamente en los Ejemplos.

## ES 2 337 424 T3

Algunas realizaciones de la invención serán descritas ahora con referencia a los dibujos que acompañan en los que:

La figura 1 proporciona las fórmulas químicas de tres poliquétidos conocidos;

5 La figura 2A es un diagrama que muestra el funcionamiento de la 6-desoxieritronolida sintasa B (DEBS), una PKS que produce 6-desoxieritronolida B (6-DEB), un precursor de la eritromicina A;

10 La figura 2B muestra la biosíntesis post-PKS de eritromicinas incluyendo la conversión de 6-DEB a la eritromicina A;

La figura 3 es un diagrama que muestra la biosíntesis de rapamicina;

La figura 4 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pDEL702;

15 La figura 5 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pJC3;

La figura 6 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pCJR701; y del plásmido precursor p20.5 que es ahora el plásmido renombrado pCJR24;

20 La figura 7 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pCJR110 que es ahora el plásmido renombrado pCJR29;

La figura 8 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pNTEP2;

25 La figura 9 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pRMTE y pCJRTE; el último plásmido es renombrado ahora como pCJR30;

La figura 10 a y b es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pIG1;

30 La figura 11 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pND20;

La figura 12 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pKW15; este incluye el ADN que codifica un módulo de carga, un primer módulo extensible, y la tioesterasa terminadora de cadena, capaz de recibir módulos;

35 La figura 13 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pAR33;

La figura 14 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pAR8;

40 La figura 15 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pE1A2TE;

La figura 16 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pKS22;

La figura 17a es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pIB018;

45 La figura 17b es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pIB017;

La figura 18 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pIBO1S y del plásmido pIB016;

La figura 19 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pJLK15;

50 La figura 20 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pJLK18;

La figura 21 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pJLK21;

55 La figura 22 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pKR1-0;

La figura 23 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pKETO;

La figura 24 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pMO7;

60 La figura 25 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pCJR26;

La figura 26 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pC-ATX;

65 La figura 27 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pC-AT12;

La figura 28 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pCJR49;

## ES 2 337 424 T3

La figura 29 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pCART11;

La figura 30 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pARE24;

5 La figura 31 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pARL3;

La figura 32 es un diagrama que muestra la construcción del plásmido pAVLD;

10 La figura 33 muestra la integración de pAVLD en el genoma de NRRL2338 de *S. erythraea*; y

La figura 34 muestra la integración de pAVLD en el genoma de TER43 de *S. erythraea*.

15 La presente invención será ilustrada a continuación por medio de algunos ejemplos, aunque no se pretende con ellos su limitación. Cualquier ejemplo que pueda estar fuera del alcance de la invención reivindicada se proporciona únicamente para ayudar a la persona experta en entender la técnica del campo técnico de la construcción de genes de PKS híbrida. Se hizo uso de los siguientes medios y soluciones.

### Medio definido de sacarosa-succinato

20	sacarosa	69 g
	KNO <sub>3</sub>	10 g
	ácido succínico	2,36 g
25	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,7 g
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,2 g
	ZnCl <sub>2</sub>	10 mg
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	6,2 g
30	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,53 mg
	CoCl <sub>2</sub>	0,55 mg
	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,5 mg
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	38 mg
35	agua milli-Q	a 11
	KOH	A pH 6-6,4
	YEME	

### Medio de agua del grifo

40	sacarosa	340 g
	glucosa	5 g
45	extracto de levadura	3 g
	triptona	5 g
	peptona	5 g
50	extracto de levadura	2,5 g
	extracto de malta	3 g
	EDTA	36 mg
	glucosa	10 g
55	agua del grifo	a 1,0 l
	KOH	a pH 7,1
	después de la esterilización: 2 ml de MgCl <sub>2</sub> 2,5M	

60 *Solución de elementos traza:* ZnCl<sub>2</sub>, 40 mg/l; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 200 mg/l; CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 10 mg/l; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 10 mg/l; Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O, 10 mg/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, 10 mg/l;

65

## ES 2 337 424 T3

### Medio BW1

	CaCO <sub>3</sub>	2 g
	Triptona de Difco	2,5 g
5	Harina de soja	5 g
	Extracto de levadura de Difco	5 g
	Almidón soluble (Sigma)	20 g
	pH 7,2	
10	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2 g
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,2 g
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,012 g
	MnSO <sub>4</sub>	0,0012 g
15	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0012 g
	Agua del grifo	hasta 1,0

### Medio BW2

	CaCO <sub>3</sub>	7 g
	Harina de soja	5 g
25	Extracto de levadura de Difco	5 g
	Almidón soluble (Sigma)	80 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g
30	10 ml de una solución de elementos traza	

Hasta 1 litro hecho con agua destilada. pH ajustado a 7,2.

### 35 Ejemplo 1

#### *Construcción de la cepa JC2 de Saccharopolyspora erythraea*

40 Fue construida una célula huésped de *S. erythraea*, genéticamente modificada para eliminar todos los genes de *eryA* naturales que codificaban la PKS tipo I productora de eritromicina, excepto para la región de ADN de *eryAIII* que codificaba la tioesterasa terminadora de cadena, por recombinación homóloga comenzando por NRRL2338 de *S. erythraea*. La NRRL2338 de *S. erythraea* es una cepa productora de eritromicina tipo silvestre obtenida de los laboratorios de investigación Northern Regional, Peoria, Illinois, EE.UU., bajo la susodicha denominación. El grupo *ery* está constituido por los genes de PKS, bordeados por otros genes implicados en etapas posteriores de la biosíntesis de eritromicina, incluyendo aquellos implicados en la glicosilación, hidroxilación y metilación.

50 El plásmido pDEL fue construido como sigue (Figura 4). El segmento SmaI de 1,4 kbp que contiene el codón de iniciación de *eryAI* se clonó en pUC18 para dar p612SL, el segmento se escindió como un fragmento BamHI-SacI usando los sitios de clonación múltiples de pUC18, y se subclonó en un derivado del plásmido pT7-18 (Roberts, G. A. *et al. Eur. J. Biochem.* (1993) **214**:305-311)) que contiene el fragmento SacI/KpnI de *eryAIII* que codifica el extremo C-terminal de DEBS3 desde el cual se había escindido un fragmento BglIII-SacI. La identidad del plásmido pDEL se confirmó mediante análisis de restricción.

55 El plásmido pDEL se digirió con BamHI y se trató con fosfatasa alcalina intestinal de ternero, y se hibridó al plásmido pIJ702 (Katz, E. *et al. J. Gen. Microbiol.* (1983) **129**:2703-2714) que había sido linearizado con BglIII. La mezcla resultante contiene el plásmido deseado pDEL702 (Figura 4).

60 Se transformaron protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea* (Yamamoto, H. *et al. J. Antibiot.* (1986) **39**:1304-1313) con 10 µg de pDEL702 y se aislaron colonias estables resistentes a la tioestreptona. Las colonias individuales se seleccionaron y se subcultivaron cuatro veces en medio líquido no selectivo (caldo de soja triptico) seguido de la preparación y regeneración de los protoplastos. Las colonias sensibles a la tioestreptona se aislaron y se caracterizaron mediante análisis de restricción e hibridación Southern. Dicha colonia fue denominada JC2. La cepa JC2 de *S. erythraea* se ha depositado en la Colección Nacional de Bacterias Industriales y Marinas, 23 St Machar Drive, Aberdeen, Escocia AB2 1RY, bajo la denominación NCIMB 40802.

## Ejemplo 2

*Construcción de la cepa JC3 de Saccharopolyspora erythraea*

5 Se construyó una célula huésped de *S. erythraea*, genéticamente modificada que contenía un plásmido derivado de pCJR29 integrado en el cromosoma útil para la expresión de genes homólogos y heterólogos mediante recombinación homóloga comenzando por JC2 de *S. erythraea* (Figura 5).

10 El plásmido pCJR29K se construyó como sigue (Figura 5), el fragmento de restricción SacI-SphI de 1,4 kbp que contiene el gen de resistencia a la kanamicina del plásmido pIJ6021 (Takano, E. *et al. Gene* (1995) **166**:133-137) se clonó en pUC18 digerido con SacI-SphI para producir pKAN, este plásmido se digirió con PvuII y el fragmento de 1,7 kbp que contenía el gen de resistencia a la kanamicina se clonó en pCJR29 digerido con EcoRV para producir el plásmido pCJR29K.

15 El plásmido pJC3 se construyó como sigue (Figura 5), el fragmento de restricción de SpeI-XbaI de 6,2 kbp de pNCO62 (Gaisser, S. *et al. Mol. Gen. Genet.* (1997) en prensa) se clonó en pCJR29K digerido con Xba I para producir pJC3.

20 Los protoplastos de JC2 de *S. erythraea*, preparados como se describe para NRRL2338 de *S. erythraea*, se transformaron con 10  $\mu$ g de pJC3 y se aislaron las colonias estables resistentes a la kanamicina (100  $\mu$ g/ml). Las colonias individuales se aislaron y se caracterizaron mediante análisis de restricción e hibridación Southern. Dicha colonia fue denominada JC3 de *S. erythraea*.

## Ejemplo 3

*Construcción de la cepa JC103 de S. erythraea (NRRL2338/pNHE)*

30 Para obtener una cepa de *S. erythraea* que sobre-expresa DEBS1, DEBS2 y DEBS3, la construcción de plásmidos intermedios fue realizada como sigue.

*Construcción de pARLD*

35 El segmento de ADN de 1,6 kbp que codifica el dominio de carga de la poliquétido sintasa de eritromicina desde el nucleótido 1 al 1680 se amplificó por PCR empleando el procedimiento CloneAmp (Raschtian, A. *et al. Anal. Biochem.* (1992) **91**: 91-97) con los dos oligonucleótidos siguientes como cebadores:

40 **5' -ACGCGUACUAGUCCGATTAATTAAGGAGGACCATCATGGCGGACC  
TGTCAAAGCTC- 3'**

y

45 **5' -AUGGAGAUUCUCUCCGCTAGCGGTTCCGCCGGGCGCCGCTTCGTTGGTCCGC  
GCGCGGTTTCCC- 3'**

50 y usando como plantilla el ADN del plásmido pNTEP2. Aproximadamente 30-60 ng del producto PCR (1,6 kbp) se digieren con la uracilo ADN glicosilasa durante 30 minutos a 37°C en presencia de 25 ng del ADN del vector de pAMPI8 (Gibco BRL), la mezcla se enfría en hielo y se usa para transformar TGirecO de *E. coli* y se comprueban las colonias individuales según su contenido de plásmido. El plásmido deseado se identifica por su mapa de restricción y se denomina pARLD.

*Construcción de pNHE*

60 Un fragmento de 1,6 kbp del plásmido pARLD se escinde usando PacI y NheI, se purifica por electroforesis de gel, y se hibrida al plásmido pCJR24 que había sido cortado con PacI y XbaI.

La mezcla de hibridación se transforma en DH10B de *E. coli* (Gibco BRL) y las colonias individuales, cultivadas en presencia de ampicilina (100  $\mu$ g/ml), se comprueban según su contenido en plásmido. El plásmido deseado se identifica por su mapa de restricción y se denomina pNHE.

65

## ES 2 337 424 T3

### Construcción de JC103 de *S. erythraea* (NRRL2338/pNHE)

Aproximadamente 5 µg de pNHE, aislados de DH10B de *E. coli* (pNHE), se usan para transformar protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea* y se seleccionan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. Se selecciona una de estas colonias y el ADN total se prepara para el análisis de hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado específicamente en la copia cromosómica del gen de eryAI en el área que codifica el dominio de carga del extremo N-terminal. Esta cepa se denomina JC103 de *S. erythraea* (NRRL2338/pNHE).

### 10 Ejemplo 4

#### Construcción del vector recombinante pCJR101

El pCJR101 (Figura 6) es un plásmido lanzadera construido para ser usado en la expresión de genes de PKS en actinomicetos. Esto incluye un replicón de ColEI para permitir que se replique en *E. coli*, un replicón de *Streptomyces* de bajo número de copia de SCP2\* (Bibb, M. J. y Hopwood, D. A. *J. Gen. Microbiol.* (1981) **126**:427) y el gen activador de actII-orf4 del grupo de act que activa la transcripción del promotor de act durante la transición desde la fase de crecimiento a la fase estacionaria en el micelio vegetativo. Es construido como sigue: un fragmento de ADN de aproximadamente 970 bp de pMF1015 (que contiene el gen activador de ActII-orf4) (Fernandez-Moreno, M. A. *et al. Cell* (1991) **66**:769-780) se amplifica por PCR, usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: 5'-ACT AGT CCA CTG CCT CTC GGT AAA ATC CAG C-3' y 5'-CTT AAG AGG GGC TCC ACC GCG TTC ACG GAC-3', que también introduce los sitios de restricción de SpeI y AflII flanqueantes. Este fragmento se introduce en el sitio de AatII reparado por el final del plásmido pUC19 para proporcionar el plásmido p18.14 (renombrado pCJR18). Un fragmento de ADN de aproximadamente 215 bp se amplifica a partir de pMV400 que contiene el par promotor bidireccional PactIII/PactI (Parro, V. *et al. Nucl. Acids Res.* (1991) **19**:2623-2627), usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos 5'-ACA TTC TCT ACG CCT AAG TGT TCC CCT CCC TGC CTC-3' y 5'-GTG ATG TAT GCT CAT ATG TGT CCT CCT TAA TTA ATC GAT GCG TTC GTC CGG TG-3', que también introduce los sitios NdeI y AflII flanqueantes. El producto PCR se digiere con NdeI y AflII y se hibrida con el plásmido p18.14 (pCJR18) antes cortado con NdeI y AflII, para generar el plásmido p19.4 (renombrado pCJR19). Se obtiene por PCR un fragmento de 1,1 kbp de HindIII-SphI que contiene el gen *tsr*, que confiere resistencia a la tioestreptona, a partir del plásmido pIJ922 (Lydiate, D. J. *et al. Gene* (1985) **35**:223-235) como plantilla, usando como cebadores los oligonucleótidos 5'-TGA ACA CCA AGC TTG CCA GAG AGC GAC GAC TTC CCC-3' y 5'-GAC AGA TTG CAT GCC CTT CGA GGA GTG CCC GCC CGG-3' que también introduce los sitios flanqueantes SphI y HindIII. El producto PCR se digiere con HindIII y SphI y se hibrida con el plásmido p19.4 (pCJR19) cortado con HindIII y SphI para obtener el plásmido p20.5 (pCJR24). El plásmido pIJ922 se digiere con BamHI y SstI y el fragmento que contiene una parte del *locus* de fertilidad y el origen de replicación (Lydiate, D. J. *et al. Gene* (1985) **35**:223-235) se hibrida en pUC19 digerido con BamHI y SstI para generar el plásmido bifuncional p16/2.2 (renombrado pCJR16) (14,7 kbp). El plásmido p20.5 (pCJR24) se digiere con SalI y SphI, los dos fragmentos más grandes de la digestión se purifican por electroforesis de gel, y se combinan en una hibridación de cuatro componentes con el plásmido 16/2.2 (pCJR16) que ha sido digerido con XhoI y SphI. La mezcla de hibridación se usa para transformar *Streptomyces lividans* y las colonias se seleccionan en presencia de tioestreptona. Una tal colonia se muestra que contiene el plásmido deseado pCJR101 (aprox. 12,4 kbp), identificado por su modelo de restricción.

### 45 Ejemplo 5

#### Construcción del plásmido pCJR29 (renombrado a partir de pCJR110)

La construcción del plásmido pCJR29 (pCJR110) se representa en la Figura 7. Se obtiene un fragmento HindIII-XhoI de 1,1 kbp que contiene el gen *tsr*, que confiere resistencia a la tioestreptona, por PCR del plásmido pIJ922 como plantilla, usando como cebadores los oligonucleótidos 5'-TGA ACA CCA AGC TTG CCA GAG AGC GAC GAC TTC CCC-3' y 5'-GAC AGA TTC TCG AGC CTT CGA GGA GTG CCC GCC CGG-3' que también introduce los sitios flanqueantes HindIII y XhoI. El producto PCR se digiere con HindIII y XhoI y se hibrida con el plásmido 16/2.2 (pCJR16) que ha sido digerido con HindIII y XhoI, para generar el plásmido 22.1 (pCJR25). El plásmido p22.1 (pCJR25) se digiere con HindIII y SphI y se hibrida con el plásmido p19.4 (pCJR19) que ha sido digerido con HindIII y SphI, para producir el plásmido deseado pCJR29 (pCJR110) (aprox. 12,4 kbp), identificado por su modelo de restricción. El plásmido pCJR29 (pCJR110) se diferencia de pCJR101 en la orientación del gen *tsr*, el gen ActIII-orf4 y el promotor actI/actIII, con respecto al origen de replicación derivado de SCP2\*.

### 60 Ejemplo 6

#### Construcción del plásmido pRM52

El plásmido pRM52 es un derivado del plásmido pRMS (McDaniel, R. *et al. Science*, (1993) **262**:1546-1550). El pRM5 se linearizó primero por digestión con NdeI, reparado por el final y luego se hibridó de nuevo para producir pRM51. El pRM51 se cortó con PacI y NsiI y el fragmento PacI-NsiI grande se aisló y se hibridó a un enlace de oligonucleótido bicatenario corto que contenía un sitio NdeI y se construyó a partir de los oligonucleótidos sintéticos 5'-TAAGGAGGACACATATGCA-3' y 5'-TAATTCCTCCTGTGTAT-3' que fueron templados juntos.

## ES 2 337 424 T3

La mezcla de hibridación se transformó en TGirecO de *E. coli* y las colonias aisladas se rastrearón según su contenido de plásmido. El plásmido deseado (19,6 kbp) se identificó por su mapa de restricción y se denominó pRM52.

### 5 Ejemplo 7

#### *Construcción del plásmido pNTEP2*

10 El plásmido pNTEP2 contiene el marco de lectura abierto entero para el DEBS1 quimérico más el gen de tioesterasa, con un sitio NdeI único en el codón de iniciación y sitios XbaI y HindIII únicos inmediatamente 3' del codón de terminación. Es construido vía varios plásmidos intermedios como sigue (Figura 8):

#### *Construcción del plásmido pTENCO11*

15 Una biblioteca de ADN total de TED8 de *S. erythraea* (Cortes, J. *et al. Science* (1995) **268**: 1487-1489) se construyó en el vector \_DASH II (Stratagene) y se sondó con fragmentos del gen de eryA. Un bacteriófago recombinante denominado  $\lambda$ -4B tenía un inserto que se extiende de 700 bp corriente arriba del codón de inicio de eryAI respecto al gen de resistencia a la tioestreptona del plásmido integrado en TED8 de *S. erythraea*.

20 El ADN de  $\lambda$ -4B se digirió con NcoI y el fragmento de 12 kbp NcoI fue reparado por el final y se hibridó en pUC18 SmaI-cut y se transformó en TGirecO de *E. coli*. Las colonias individuales se rastrearón según su contenido de plásmido y un plásmido que lleva el inserto de NcoI se seleccionó y se denominó pTENCO11.

#### *Construcción del plásmido pNK8*

25 Un fragmento de KpnI de 4,0 kilobytes que se extiende desde 1,4 kbp corriente arriba del codón de inicio de eryAI correcto como se ha determinado previamente (Caffrey, P. *et al. FEBS Letters* (1992) **304**:225-228), a 2,6 kbp dentro del gen de eryAI de *S. erythraea*, se escindió del plásmido pBK25 (Bevitt, D. J. *et al. Eur. J. Biochem.* (1992) **204**:39-49) y se clonó en pUC18 para obtener el plásmido pBK6.12. El ADN de este plásmido se usó como plantilla para una reacción PCR para obtener un producto de 360 bp en el que un único sitio Nde I es creado en el codón de iniciación de eryAI y un sitio único SmaI es creado en el otro extremo del producto PCR. Los oligonucleótidos usados fueron 5'-CCC ATA TGG CGG ACC TGT CAA AGC-3' y 5'-ATT GCG CGC CCT GGC CCG GGA A-3'. El producto se reparo por el final y se hibridó en pUC18 cortado por SmaI, y se transformó en TGirecO de *E. coli*.

35 Las colonias individuales se rastrearón según su contenido de plásmido y se seleccionó un plásmido que llevaba el inserto en una orientación tal que el sitio SmaI era adyacente al sitio KpnI del polienlazante y el plásmido se denominó pNDE6. El plásmido pNDE6 se digirió con SmaI y KpnI, y se hibridó con un fragmento de 2,3 kbp del gen eryAI obtenido por la digestión del plásmido pBK6.12 con SmaI y KpnI. La mezcla de hibridación se usó para transformar TGirecO de *E. coli* y las colonias individuales se rastrearón según su contenido de plásmido. Se aisló un plásmido que contenía el fragmento de NdeI-KpnI de 2,6 kbp deseado y se denominó al plásmido pNDE7. El inserto de NdeI-KpnI se escindió del plásmido pNDE7 y se hibridó en el plásmido pT7-18, previamente digerido con NdeI y KpnI. El plásmido pT7-18 es un derivado del plásmido pT7-7 (Tabor, S. y Richardson, C.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) **82**:1074-1078) en el que el polienlazante se sustituye por el polienlazante de pUC18. La mezcla de hibridación se usó para transformar TGirecO de *E. coli* y las colonias individuales se rastrearón según su contenido de plásmido y se seleccionó un plásmido que contenía el inserto de NdeI-KpnI de 2,6 kbp deseado y se denominó pNK8.

#### *Construcción del plásmido pNTE5*

50 El plásmido pNK8 se transformó en una cepa deficiente por metilación de ET12567 de *E. coli* (MacNeil, D.J. *et al. Gene* (1992) **111**:61-68) y el plásmido pNK8 se aisló de esta cepa y se digirió con ClaI. Un fragmento de ClaI de 11 kbp obtenido por la digestión de pTENO011 se hibridó en el pNK8 digerido y se transformó en TGirecO de *E. coli*. Las colonias individuales se rastrearón según su contenido de plásmido y se seleccionó un plásmido, en el cual el inserto de 11 kbp estaba correctamente orientado para regenerar el marco de lectura de eryAI, y se denominó pNTE5.

#### 55 *Construcción del plásmido pNTEP2*

Se construyó un polienlazante de ClaI-EcoRI, que llevaba sitios de restricción únicos para XbaI y para HindIII, a partir de los oligonucleótidos sintéticos complementarios siguientes: 5'-AATTCATAGTCTAGAAGCTTAT-3' y 5'-CGATAAGCTTCTAGACTATG-3'.

60 El polienlazante se hibridó en el plásmido pNTE5, que había sido digerido con ClaI y EcoRI para quitar un fragmento de ClaI-EcoRI de 2,3 kbp. La mezcla de hibridación se usó para transformar TGirecO de *E. coli* y las colonias individuales se rastrearón según su contenido de plásmido. Se identificó un plásmido que contenía el polienlazante y se denominó pNTEP2.

65

## ES 2 337 424 T3

### Ejemplo 8

#### *Construcción del plásmido pRMTE*

5 El plásmido pNTEP2 (14 kbp) se digirió con NdeI y XbaI y el inserto se purificó por sedimentación en un gradiente de sacarosa. El inserto purificado se hibridó en el plásmido pRM52 (19,6 kbp) (Ejemplo 4) que había sido digerido con NdeI y XbaI, y el vector se purificó por sedimentación en un gradiente de sacarosa. La mezcla de hibridación se usó para transformar *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pRMTE (31,5 kbp) se identificó por su modelo de restricción (Figura 9).

10

### Ejemplo 9

#### *Construcción del plásmido pCJRTE (también denominado pCJR30)*

15

El plásmido pNTEP2 (Ejemplo 5) se digiere con NdeI y XbaI y el inserto se purifica por sedimentación en un gradiente de sacarosa. El inserto purificado se hibrida en el plásmido pCJR101 (12,4 kbp) que ha sido digerido con NdeI y XbaI, y se purifica por sedimentación en un gradiente de sacarosa. La mezcla de hibridación se usa para transformar DHB10 de *E. coli* y las colonias individuales se rastrean según su contenido de plásmido. El plásmido deseado pCJRTE (pCJR30) (24,3 kbp) se identifica por su modelo de restricción (Figura 9).

20

### Ejemplo 10

25 *Construcción de ATCC 31272/pCJRTE de S. avermitilis (pCJR30) y producción de derivados de triquetida lactona ("TKL") con el mismo*

#### (i) *Construcción*

30 Se transforman aproximadamente 5  $\mu$ g del plásmido pCJRTE (pCJR30) en protoplastos de ATCC 31272 de *S. avermitilis* y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. Se analizan diversas colonias según su contenido de ADN del plásmido. Una colonia que contenía un plásmido cuyo mapa de restricción muestra que es idéntico a pCJRTE (pCJR30), se denomina ATCC 31272/pCJRTE de *S. avermitilis* (pCJR30).

35 (ii) *Producción de (Ac)-TKL y TKL*

Se inocula ATCC 31272/pCJRTE de *S. avermitilis* (pCJR30) en medio BW1 que contiene 50  $\mu$ g/ml de tioestreptona, y se deja crecer durante cuatro días a 28-30°C. Después de este tiempo, se usan 15 ml de la suspensión celular para inocular 150 ml de medio líquido BW2 que contiene 50  $\mu$ g/ml de tioestreptona, y se deja crecer durante 6 días. Después de este tiempo, las células se eliminan por centrifugación, se lavan con agua, y los sobrenadantes se combinan y se extraen tres veces con acetato de etilo (250 ml). Los extractos de acetato de etilo combinados se lavan con un volumen igual de cloruro de sodio saturado, se secan sobre sulfato de sodio anhidro y se elimina el acetato de etilo por evaporación bajo presión reducida. Se toman muestras del residuo en una cantidad mínima de éter de dietilo, se filtran mediante un tapón de sílice y se analizan por CG, revelando la presencia tanto de (Ac)-TKL como de TKL (Fórmula II: R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=Me; R<sub>3</sub>=Me para (Ac)-TKL, y Et para TKL), con tiempos de retención idénticos con relación a muestras sintéticas auténticas.

45

### Ejemplo 11

50

#### *Construcción del plásmidos pIG1 y pIG101*

Los plásmidos pIG1 y pIG101 consiste cada uno en un plásmido derivado de SCP2\* que contiene un gen de PKS Tipo I híbrido que comprende el módulo de carga de avr en lugar del módulo de carga de ery, los dos primeros módulos de extensión de la PKS de ery y la tioesterasa de la PKS de ery. Éstos se construyen vía varios plásmidos intermedios como sigue (Figura 10).

55

#### *Construcción del plásmido pVE 3.4*

60 El plásmido pVE1446 que contiene una parte de los genes de PKS de avermectina (avr) se obtuvo de la cepa de *E. coli* ATCC 68250 (MacNeil, D. J. *et al. Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1994) **721**:123-132). El plásmido pVE1446 se digirió con BamHI y el fragmento de 7,6 kbp entre las coordenadas 32,15 y 3,40 (MacNeil, D. J. *et al. Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1994) **721**:123-132) se purificó por electroforesis de gel y se circularizó de nuevo. La mezcla contenía el plásmido deseado pVE3.4 que se aisló después de la transformación de la cepa de *E. coli* TGIrecO.

65

## ES 2 337 424 T3

### Construcción del plásmido pNCO12

El plásmido pBK25 (Bevitt, D. J. *et al. Eur. J. Biochem.* (1992) **204**:39-49) se digirió con NcoI y el fragmento de 12 kbp se reparó por el final y se hibridó en el plásmido pUC18 que había sido linearizado con SmaI. La mezcla de hibridación se transformó en TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pNCO12 se identificó por su modelo de restricción.

### Construcción del plásmido pCRabc

El plásmido pCRabc (Figura 10) se construyó como sigue. Se llevaron a cabo tres reacciones PCR separadas: Primera, se usaron 20 pmol de cada uno de los oligonucleótidos sintéticos A1 (5'-CTC GTC GGT GGC TTT GCG-3') y A2 (5'-CCC GGG AAA AAC GAA GAC TAG TGG CGC GGA CGG CCG-3') para amplificar un producto de 1,0 kbp a partir de 100 ng de plantilla pNCO12. El producto PCR se reparó por el final, se fosforiló y se clonó en SmaI-cut pUC18 para obtener el plásmido pCRa. En segundo lugar, se usaron 20 pmol de cada uno de los oligonucleótidos sintéticos C1 (5'-CAC GCG CAG CGC GGC GGA-3') y C2 (5'-CGAA CCG CTA GCG GTC GTC GCG ATG GCC T-3') para amplificar un producto de 1,5 kbp de 100 ng de plantilla de pNCO12. El producto se reparó por el final, se fosforiló y se clonó en pUC18 SmaI-cut para obtener el plásmido pCRc. En tercer lugar, se usaron 20 pmol de cada uno de los oligonucleótidos sintéticos B1 (5'-GTGGCCCCGGCCGTCCGCGCCACTAGTCTTCGTTTTT-3') y B2 (5'-AACAGCTAGCGGTTTCGTCCGCCGCTGCCGTGCC-3') para amplificar un producto de 1,4 kbp de 100 ng de plantilla pVE3.4. El producto se reparó por el final, se fosforiló y se clonó en pUC18 SmaI-cut para obtener el plásmido pCRb.

El plásmido pCRa se digirió con HindIII y SpeI y el inserto de 1,0 kbp se hibridó con el plásmido pCRb previamente digerido con HindIII y SpeI, para obtener el plásmido pCRab. El plásmido pCRc se digirió con NheI y EcoRI y el inserto de 1,5 kbp se hibridó con el plásmido pCRab previamente digerido con NheI y EcoRI para obtener el plásmido pCRabc.

### Construcción del plásmido pNEWAVETE

El plásmido pCRabc se digirió con MfeI y SfiI y el fragmento de ADN que contenía el dominio de carga de la PKS de avr se purificó por electroforesis de gel y se hibridó con el plásmido pNTEP2 que había sido digerido con MfeI y SfiI y el fragmento más grande se purificó por electroforesis de gel. La mezcla de hibridación se transformó en TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pNEWAVETE (13,7 kbp) se identificó por su modelo de restricción.

### Construcción del plásmido pIG1

El plásmido pNEWAVETE se digirió con NdeI y XbaI y el inserto se purificó por sedimentación en un gradiente de sacarosa. El inserto purificado se hibridó en el plásmido pRM52 (19,6 kbp) que había sido digerido con NdeI y XbaI, y el vector se purificó por sedimentación en un gradiente de sacarosa. La mezcla de hibridación se usó para transformar *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pIG1 se identificó por su modelo de restricción.

### Construcción del plásmido pIG101

El plásmido pNEWAVETE se digiere con NdeI y XbaI y el inserto se purifica por sedimentación en un gradiente de sacarosa. El inserto purificado se hibrida en el plásmido pCJR101 (Ejemplo 4) que ha sido digerido con NdeI y XbaI, y se purifica por electroforesis de gel. La mezcla de hibridación se usa para transformar DHB10 de *E. coli* y las colonias individuales se rastrean según su contenido de plásmido. El plásmido pIG101 deseado se identifica por su modelo de restricción.

### Ejemplo 12

#### Construcción de CH999/pIG1 *S. coelicolor* y producción de derivados de TKL

##### (i) Construcción

El plásmido pIG1 que había sido aislado de ET12567 de *E. coli* (MacNeil, D. J. *et al. Gene* (1992) **111**:61-68) se usó para transformar protoplastos de CH999 y se aislaron colonias estables resistentes a la tioestreptona. Se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales y se confirmó la presencia del plásmido pIG1 por su modelo de restricción.

##### (ii) Producción de TKL, (Ac)TKL, (i-but)TKL y (s-pent)TKL usando CH999/pIG1 de *S. coelicolor*

Se inoculó CH999/pIG1 de *S. coelicolor* en 100 ml de medio YEME que contenía 50 µg/ml de tioestreptona y se dejó crecer durante cinco días a 28-30°C. Después de este tiempo, el caldo se filtró para eliminar los micelios. El caldo se extrajo tres veces con cuartos volúmenes de acetato de etilo y los extractos de acetato de etilo combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y el acetato de etilo se eliminó bajo presión reducida. El residuo se tomó en

## ES 2 337 424 T3

acetato de etilo y se filtró mediante un tapón de sílice, el acetato de etilo se eliminó otra vez y el residuo se llevó en éter de dietilo y se sometió a cromatografía súbita en una columna del gel de sílice eluída con éter de dietilo. Se separó una fracción que contenía (s-pent)-TKL e ("i-but")-TKL de una fracción que contenía TKL, con cantidades menores de (Ac)-TKL en una tercera fracción. Los compuestos se identificaron por su co-migración con estándares auténticos en análisis CG (columna de 25 m, programada durante 2 minutos a 70°C, después incremento a 250°C durante 24 minutos. Los tiempos de retención para (s-pent)-TKL, ("i-but")-TKL, TKL y (Ac)-TKL fueron 14,9, 13,6, 12,9 y 11,9 minutos respectivamente. Se usaron la CG, MS electropulverización. y 1H-RMN para mostrar que el componente principal (50-60%) era TKL.

### 10 Ejemplo 13

*Construcción de CH999/pIG101 de S. coelicolor y producción de derivados de TKL*

#### 15 (i) Construcción

El plásmido pIG101 que se ha aislado a partir de ET12567 de *E. coli* (MacNeil, D. J. *et al. Gene* (1992) **111**:61-68) se usa para transformar protoplastos de CH999 de *S. coelicolor* y se aislaron las colonias estables resistentes a la tioestreptona. Se comprueba el contenido de plásmido de las colonias individuales y la presencia de plásmido el pIG101 se confirma por su modelo de restricción.

(ii) *Producción de TKL, (Ac)TKL, (i-but)TKL y (s-pent)TKL usando CH999/pIG101 de S. coelicolor*

Se inocula CH999/pIG101 de *S. coelicolor* en medio YEME que contiene 50 µg/ml de tioestreptona y se deja crecer durante cinco días a 28-30°C. El caldo se extrae tres veces con cuarto de volúmenes de acetato de etilo y los extractos de acetato de etilo combinados se secan sobre sulfato de sodio anhidro, y se elimina el acetato de etilo bajo presión reducida. El residuo se trató como en el Ejemplo 12 y dio resultados similares.

### 30 Ejemplo 14

*Construcción de ATCC31272/pIG1 de S. avermitilis y producción del derivado de TKL*

#### 35 (i) Construcción

El plásmido pIG1 que había sido aislado de ET12567 de *E. coli* (MacNeil, D. J. *et al. Gene* (1992) **111**:61-68) se transformó en protoplastos de ATCC31272 de *S. avermitilis* y se aislaron las colonias estables resistentes a la tioestreptona. Se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales y la presencia del plásmido pIG1 se confirmó por su modelo de restricción.

(ii) *Producción de TKL, (Ac)TKL, (i-but)TKL y (s-pent)TKL usando ATCC31272/pIG1 de S. avermitilis*

Se inoculó primero ATCC31272/pIG1 de *S. avermitilis* en medio BW1 que contenía 50 µg/ml de tioestreptona, y se dejó crecer durante cuatro días a 28-30°C. Después de este tiempo, se usaron 20 ml del caldo para sembrar 150 ml de medio BW2 que contenía 50 µg/ml de tioestreptona.

Se permitió entonces que el organismo inoculado creciera durante 10-12 días. El caldo se filtró para quitar los micelios, y se extrajo tres veces con cuarto volúmenes de acetato de etilo y los extractos de acetato de etilo combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y el acetato de etilo se eliminó bajo presión reducida, para dar el producto ordinario de aproximadamente 10 mg por litro. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se pasó a través de un tapón de sílice, y el disolvente se eliminó. El residuo se disolvió en éter de dietilo y se sometió a cromatografía súbita en una columna de sílice (1 cm x 15 cm) eluída con éter de dietilo, y se recuperaron fracciones de 10 ml cada una y se analizaron por GC. El éter de dietilo se evaporó para dejar aproximadamente 10 mg del residuo aceitoso que contenía triquetida lactonas. El componente principal (50-60%) fue (s-pent)-TKL, (i-but)-TKL, TKL y (Ac)-TKL también presente (es decir, los compuestos de fórmula II con R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=Me, y R<sub>3</sub>=1-metilpropilo ((s-pent)-TKL), i-Pr((i-but)-TKL), Et(TKL) y Me((Ac)-TKL).

### 60 Ejemplo 15

*Construcción de ATCC31272/pIG101 de S. avermitilis y producción de derivados de TKL*

#### 65 (i) Construcción

El plásmido pIG101 que se ha aislado de ET12567 de *E. coli* (MacNeil, D. J. *et al. Gene* (1992) **111**:61-68) se transforma en protoplastos de ATCC31272 de *S. avermitilis* y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. Se comprueba el contenido de plásmido de las colonias individuales y la presencia del plásmido pIG101 se confirma por su modelo de restricción.

## ES 2 337 424 T3

(ii) *Producción de TKL, (Ac)TKL, (i-but)TKL y (s-pent)TKL usando ATCC31272/pIG101 de S. avermitilis*

Primero se inocula ATCC31272/pIG101 de *S. avermitilis* en medio BW1, descrito anteriormente y se deja crecer durante 10-12 días. El aislamiento de productos como en el ejemplo anterior da una fracción que contiene (s-pent)-TKL y (i-but)-TKL, una fracción que contiene TKL, y una tercera fracción con cantidades menores de (Ac)-TKL. Los compuestos se identifican por su co-migración con estándares auténticos en el análisis CG.

### Ejemplo 16

10

*Construcción de JC2/pIG1 de S. erythraea y producción de derivados de TKL*

(i) *Construcción*

15 Se transforman aproximadamente 5 µg del plásmido pIG1 en protoplastos de JC2 de *S. erythraea* y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado específicamente en la parte del gen eryAIII que codifica la tioesterasa/ciclasa del extremo C-terminal, mediante recombinación homóloga.

20 (ii) *Producción de triquetida lactonas usando JC2/pIG1 de S. erythraea*

Se inocula JC2/pIG1 de *S. erythraea* en medio de agua del grifo que contiene 50 µg/ml de tioestreptona y se deja crecer durante cuatro días a 30°C. Después de esto, se usan 20 ml de micelio para sembrar 500 ml de medio sacarosa-succinato que contienen 50 µg/ml de tioestreptona, en un matraz de 2L con un muelle sencillo para reducir la aglutinación, agitado a 280 revoluciones por minuto. Después de entre 3,5 y 6 días, el caldo se filtra para quitar los micelios y luego se extrae tres veces con un cuarto volumen de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se secan sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se elimina por evaporación. El análisis de la mezcla del producto usando CG y MS electropulverización reveló que de un total de 5-6 mg/L de productos de triquetida lactona, el componente principal fue (s-pent)-TKL (aproximadamente 1,5 mg/L), siendo otros componentes presentes (i-but)-TKL, TKL y una cantidad menor de (Ac)-TKL.

30

### Ejemplo 17

35 *Construcción de JC2/pIG101 de S. erythraea y producción de derivados de TKL*

(i) *Construcción*

40 Se transforman aproximadamente 5 µg del plásmido pIG101 en protoplastos de JC2 de *S. erythraea* y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado específicamente en la parte del gen eryAIII que codifica la tioesterasa/ciclasa del extremo C-terminal, mediante recombinación homóloga.

(ii) *Producción de triquetida lactonas usando JC2/pIG101 de S. erythraea*

45

Se siguió el mismo procedimiento que en el Ejemplo 16 (ii). El análisis de la mezcla de producto usando GC y MS electropulverización reveló que de un total de 5-6 mg/L de productos de triquetida lactona, el componente principal fue (s-pent)-TKL (aproximadamente 1,5 mg/L), siendo otros componentes presentes (i-but)-TKL, TKL y una cantidad menor de (Ac)-TKL.

50

### Ejemplo 18

*Construcción del plásmido pND20*

55

Este fue llevado a cabo en dos etapas:

(i) *Construcción del plásmido pHISAVE*

60 El plásmido pNEWAVE se digirió con EcoRI e HindIII y el vector se purificó por electroforesis de gel. Un inserto bicatenario de oligonucleótido sintético que codifica un marcador de 6-histidina y que posee estos sitios en cada extremo (mostrado más abajo) se hibridó al vector.

(5'-AATTCACATCACCATCACCATCACTAGTAGGAGGTCTGGCCATCTAGA-3') (3'-GTAGTGGTAGTGG-TAGTGATCATCCTCCAGACCGGTAGATCTTCGC-5')

65

La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y las colonias individuales se rastrearon según su contenido de plásmido. El plásmido deseado, el pHISAVE se identificó por su modelo de restricción.

## ES 2 337 424 T3

### (ii) Construcción del plásmido pND20

El plásmido pHISAVE se digirió con NdeI y XbaI y el inserto se hibridó en pCJR24 digerido con NdeI y XbaI. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B y las colonias individuales se rastrearán según su contenido de plásmido. El plásmido deseado, el pND20 se identificó por su modelo de restricción.

### Ejemplo 19

#### 10 (i) Construcción de JC3/pND20 de *S. erythraea*

El plásmido pND20 que se ha aislado de ET12567 de *E. coli* se usa para transformar protoplastos de JC3 de *S. erythraea* y se aíslan las colonias estables de tioestreptona.

#### 15 (ii) Producción de TKL y (Ac)TKL

Se inocula JC3/pND20 de *S. erythraea* en medio de agua del grifo que contiene 50 µg/ml de tioestreptona y se deja crecer durante cuatro días a 30°C. 20 ml de esto se usan para inocular 500 ml del medio sacarosa-succinato que contienen 50 µg/ml de tioestreptona, en un matraz de 2L con un muelle sencillo para reducir la aglutinación y se agita a 280 revoluciones por minuto. Después de entre 3,5 y 6 días, el caldo se filtra para quitar los micelios y luego se extrae tres veces con un cuarto volumen de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se secan sobre sulfato de sodio anhidro y el solvente se elimina por evaporación. El análisis de la mezcla del producto usando GC y MS electropulverización revela que de un total de aproximadamente 20 mg/L de productos de triquetida lactona, aproximadamente el noventa por ciento consistió en TKL y el resto era Ac(TKL).

### Ejemplo 20

#### 30 Construcción del plásmido pKW15

El plásmido pKW15 es un vector derivado de pT7 que contiene un inserto que comprende el módulo de carga, el primer módulo de extensión y la tioesterasa de la PKS de ery, adecuado para subclonar en un vector basado en SCP2\* para obtener la expresión de un gen de sintasa diquetida; y también adecuado para la introducción del ADN heterólogo que contiene uno o varios módulos intactos. El plásmido pKW15 se obtiene vía varios plásmidos intermedios como sigue (Figura 12).

#### 35 Construcción del plásmido pKW11

El plásmido pNTEP2 (Ejemplo 5) se digirió con BglII, los extremos adhesivos se rellenaron e hibridaron de nuevo, para producir el plásmido pKW11. El inserto en el plásmido pKW11 consiste en un gen de eryAI-eryAIII quimérico que abarca el dominio de carga, módulo 1 y módulo 2 de DEBS1 y la tioesterasa de DEBS3. La estrategia para obtener esta "diquetida sintasa" era eliminar el ADN que codifica parte del módulo 1, todo el módulo 2 y parte de la tioesterasa, por digestión del plásmido pKW11 con EcoRV y EcoRI, y luego reconstituir el módulo 1 y la parte del extremo N-terminal de ACP1 por la introducción de un producto PCR apropiado, y de manera similar se diseñó un producto PCR para sustituir la parte del extremo C-terminal de ACP2 y la tioesterasa. Los dos productos PCR se unen por un sitio único BglII creado con el sitio activo de ACP, lo que implica una modificación en la secuencia de aminoácidos del dominio de ACP híbrido EL (ácido glutámico seguido de leucina) como se encuentra tanto en los dominios ACP1 como en ACP2, a DL (ácido aspártico seguido de leucina). Tales modificaciones en la secuencia en un sitio activo de PKS, con miras a retener la función, no han sido intentadas antes y no es obvio que tales sitios modificados deban permanecer activos.

#### 40 Construcción de los plásmidos pKW12, pKW13, pKW14 y pKW15

Para la amplificación por PCR del ADN para el módulo 1, se usaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos como cebadores mutagénicos, uno que contiene un sitio EcoRV y el otro un sitio BglII:

5'-GCAGGGATATCGCACGTTCTGG-3' y

5'-CGCCGAGATCTGCGAAGGCCTGGTCGGCGGG-3'

El PCR se realizó en pNTEP2 como plantilla usando la ADN polimerasa de Pfu y 30 ciclos del 95% (1 minuto); hibridación a 55°C (1 minuto) y amplificación a 72°C (2 minutos), en presencia de dimetilsulfóxido al 10% (vol/vol). El producto (PCR1) se reparó por el final y se clonó en el fagémido de SmaI-cut pUC119 y la mezcla de hibridación se usó para transformar TG1recO de *E. coli*. El ADN del plásmido se preparó a partir de colonias individuales y el plásmido deseado (5,0 kbp) se identificó por su modelo de restricción y se denominó pKW12.

## ES 2 337 424 T3

Para la amplificación por PCR del ADN para el extremo 5' final del módulo 2 y el dominio de tioesterasa, se usaron los siguientes oligonucleótidos que contienen respectivamente un sitio de Bgl II y un sitio de EcoRI, como cebadores mutagénicos:

- 5 5'-ATGAATTCCTCCGCCAGCCAG-3' y  
5'-ACAGATCTCGGCTTCGACTCGCTGACCG-3'

La PCR se realizó con pNTEP2 como plantilla exactamente como se describe antes para la PCR1 y el producto (PCR2) se reparó por el final y se clonó en el fagémido de SmaI-cut pUC119. La mezcla de hibridación se usó para transformar TGirecO de *E. coli* y el ADN del plásmido se preparó a partir de colonias individuales. El plásmido deseado (4,1 kbp) se identificó por su modelo de restricción y se denominó pKW13.

El plásmido pKW12 se digirió con EcoRV e HindIII, y el inserto de 1,8 kbp se reparó por el final, y luego se hibridó junto con el plásmido pKW11 que había sido linearizado con EcoRV y que se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se transformó en TGirecO de *E. coli* y el contenido del plásmido de las colonias individuales fue comprobado. El plásmido deseado (15,8 kbp) se identificó en que el sitio Eco RV único había sido reconstituido, y este plásmido se denominó pKW14.

El plásmido pKW13 se digirió con BglII y EcoRI y el inserto de 0,9 kbp se hibridó en el plásmido pKW14 que había sido digerido con BglII y EcoRI. La mezcla de hibridación se transformó en TGirecO de *E. coli* y el contenido del plásmido de las colonias individuales fue comprobado. El plásmido deseado (9,32 kbp) se identificó, en que el fragmento de 0,9 kbp de BglII-EcoRI de pKW13 sustituyó al segmento de 9,5 kbp de BglII-EcoRI de pKW14, y este plásmido se denominó pKW15.

### Ejemplo 21

#### *Construcción y uso del plásmido pKW16*

##### (i) *Construcción*

El plásmido pKW15 se digirió con NdeI y XbaI y el inserto se hibridó en el plásmido pRM52 que también había sido digerido con NdeI y XbaI. La hibridación se transformó en TGirecO de *E. coli* y las colonias aisladas se rastrearon según su contenido de plásmido. El plásmido deseado se identificó por su mapa de restricción y se denominó pKW16.

##### (ii) *Uso del plásmido pKW16 para la construcción de CH999/pKW16 de S. coelicolor*

El plásmido pKW16 se usó para transformar la cepa de *E. coli* ET12567 deficiente de metilación (MacNeil, D. J. *et al. Gene* (1992) **111**:61-68) y el ADN del plásmido desmetilado pKW16 aislado de esta cepa se usó para transformar CH999 de *S. coelicolor* (McDaniel, R. *et al. Science* (1993) **262**:1546-1550. Los protoplastos de *S. coelicolor* se transformaron con pKW16 y se transfirieron colonias estables resistentes a la tioestreptona a placas de agar-agar con medio de agua del grifo que contenía 50 µg/ml de tioestreptona.

##### (iii) *Aislamiento y caracterización de (2S)-metil-(3R)-ácido hidroxipentanoico y (2S)-metil-(3R)-ácido hidroxibutanoico*

Se escogió una colonia de CH999/pKW16 *S. coelicolor* y se trasladó a 100 ml de YEME suplementado con 50 µg/ml de tioestreptona y se permitió crecer a 30°C. Después de 4 días el caldo se filtró para eliminar los micelios, se acidificó a pH 3,0 y se añadió cloruro de sodio sólido hasta que la solución estuviera saturada. El caldo se extrajo 5 veces con un volumen igual de acetato de etilo, y los extractos de acetato de etilo combinados se secaron por extracción con la solución de cloruro de sodio saturada y se concentró por evaporación. La cromatografía de capa fina en placas de gel de sílice, eluida con acetato de etilo:ácido acético 99:1 (v/v) y teñida con permanganato de potasio, mostró la presencia de un compuesto con la misma movilidad (Rf 0,55) como una muestra de referencia de (2S)-metil-(3R)-ácido butanoico, que no estaba presente en un extracto obtenido de CH999 de *S. coelicolor* solo. El análisis por espectrometría de masas por electropulverización (ESMS), en el modo de ión negativo, de los extractos de acetato de etilo mostró un pico principal en m/e 117 no presente en la muestra de control. En el modo de ión positivo, y en presencia de ácido fórmico, se observó un pico en m/e 119, que cambió a m/e 141 en presencia de iones de sodio añadidos. La masa exacta del aducto de sodio se determinó que era 141,05171 (la sal de sodio del ácido 2-metil-3-hidroxibutanoico requiere 141,05248). Se escogió una colonia de CH999/pKW16 de *S. coelicolor* y se trasladó a 100 ml de YEME suplementado con 50 µg/ml de tioestreptona y se permitió crecer a 30°C durante 7 días, un extracto de acetato de etilo preparado como antes mostró un pico adicional, en ESMS operado en el modo de ión negativo a m/e 131. En el ESMS operado en el modo de ión positivo, y en presencia del ácido fórmico añadido, el pico se encuentra a m/e 155. La masa exacta de este pico se determinó que era 155,06973 (la sal de sodio del ácido 2-metil-3-hidroxipentanoico requiere 155,06890).

## ES 2 337 424 T3

### Ejemplo 22

#### Construcción del plásmido pAR33

5 El plásmido pAR33 contiene una PKS Tipo I híbrida que comprende el módulo de carga de ery, módulo de extensión 1 de la PKS de ery, módulo de extensión 12 de la PKS de rap y la ery tioesterasa terminadora de cadena. Se construye vía varios plásmidos intermedios como sigue (Figura 13):

#### Construcción del plásmido pARRAP

10 El segmento de ADN de 4,7 kbp del gen de rapC que codifica el módulo 12 de la PKS de rapamicina se amplificó por PCR empleando el procedimiento de CloneAmp (Raschtian, A. *et al. Anal. Biochem.* (1992) **91**:91-97) y con los dos siguientes oligonucleótidos como cebadores:

15 **5' -**  
**ACGCGUACUAGUCAGATCTGGGCATCAATTGCGTGACCGCGGTGGAAGCTGCGCAA-**  
**3'**

20

25 **5' -**  
**AUGGAGAUCUCUCAGATCTTGAATGCGGCGGCTGCGGGGATGGTGCTGGCGTCA-**  
**3' ,**

30 y usando como plantilla el ADN del clon  $\sim\lambda$ -1C (Schwecke, T. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) **92**:7839-7843). Aproximadamente 30-60 ng del producto PCR (4,7 kbp) se digieren con la uracilo ADN glicosilasa durante 30 minutos a 37°C en presencia de 25 ng de ADN del vector de pAMP18 (Gibco BRL), la mezcla se enfría en hielo y se transforma en TG1recO de *E. coli* y se comprueban las colonias individuales según su contenido de plásmido. El plásmido deseado (7,4 kbp) se identifica por su mapa de restricción y se denomina pARRAP.

#### Construcción del plásmido pAR32

40 El plásmido pARRAP se digiere con BglII para liberar el fragmento de 4,7 kbp que codifica el módulo de rap 12, que se purifica por electroforesis de gel y luego se hibrida en el plásmido pKW15, que se ha linearizado por digestión con BglII. La mezcla de hibridación se transforma en TG1recO de *E. coli* y se comprueban las colonias individuales según su contenido de plásmido. El plásmido deseado es aquel en el cual el módulo de rap 12 tiene la orientación correcta con respecto a la secuencia de codificación del marco de lectura abierto del inserto en pKW15, de modo que sea producido un gen de triquetida lactona sintasa híbrido. Tal plásmido se identifica por su modelo de restricción, y se denomina pAR32.

#### Construcción del plásmido pAR33

50 El plásmido pAR32 contiene un inserto que puede ser escindido por digestión con NdeI y XbaI, pero hay un sitio NdeI adicional en el inserto que debe ser específicamente protegido contra la división. Esto se hace usando el método de protección RecA (Koob, M. *et al. Nucl. Acids Res.* (1992) **20**:5831-5835)). El oligonucleótido sintético 5'GCACC CACGACGCCACCACCACATATGCCCTGCACCCTGCCCTCC-3' (en el que el sitio NdeI está subrayado) se usa junto con la proteína RecA purificada y ATP<sub>S</sub>, para formar un complejo de ADN-proteína triple estable que protege específicamente de la digestión el sitio NdeI interno en el módulo de rap 12. El plásmido protegido pAR32 se digiere con NdeI y XbaI, produciendo el inserto de cadena entera deseado (13,1 kbp), y este se hibrida con el plásmido pRM52 (Ejemplo 4) que ha sido digerido con NdeI y XbaI. La mezcla de hibridación se transforma en TG1 recO de *E. coli* y las colonias individuales se rastrean según su contenido de plásmido. El plásmido deseado pAR33 se identifica por su modelo de restricción.

### Ejemplo 23

#### Construcción de JC2/pAR33 de *S. erythraea* y preparación de derivados de TKL

##### 65 (i) Construcción

Se transforman aproximadamente 5  $\mu$ g del plásmido pAR33 en protoplastos de JC2 de *S. erythraea* y se seleccionan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. El ADN total de dicha colonia se aísla y se analiza por hibridación

## ES 2 337 424 T3

Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado específicamente en la copia cromosómica de la parte del gen *eryAIII* que codifica la tioesterasa/ciclasa del extremo C-terminal. Esta cepa se denomina JC2/pAR33 de *S. erythraea*.

### (ii) Producción de una nueva triquetida lactona por JC2/pAR33 de *S. erythraea*

5 Se inocula JC2/pAR33 de *S. erythraea* en medio sacarosa-succinato que contienen 50 µg/ml de tioestreptona, y se deja crecer durante cinco días a 28-30°C. Después de este tiempo, el caldo se filtra, y se extrae dos veces con un volumen igual de acetato de etilo, y los extractos de acetato de etilo combinados se secan sobre sulfato de sodio anhidro y se elimina el acetato de etilo por evaporación bajo presión reducida. La MS por electropulverización del  
10 residuo mostró la presencia de Ac-2-nor-3-epi-TKL (III, R=Me) y 2-nor-3-epi-TKL (III, R=Et).

### Ejemplo 24

#### 15 Construcción del plásmido pAR8

Construcción de un híbrido de triquetida lactona sintasa que contiene el dominio de carga de *ery* y la tioesterasa terminadora de cadena/ciclasa de *ery*, y los módulos 11 y 12 de la PKS de *rap*.

20 Este ejemplo requiere la construcción inicial de cinco plásmidos separados, cuatro albergando elementos separados del constructo objetivo, y un quinto albergando un gen que confiere resistencia a la tetraciclina. Los insertos en estos plásmidos se combinan secuencialmente mediante técnicas de ADN recombinante estándar *in vitro* para formar el plásmido pAR5. Tres etapas de clonación adicionales conducen al plásmido de expresión final pAR8 (Figura 14).

#### 25 Construcción del plásmido pARLD

El segmento del gen de *AI* de *ery* desde el nucleótido 1 al nucleótido 1673, que codifica el didominio de carga AT-ACP, se amplificó por PCR empleando el procedimiento de CloneAmp con los dos oligodesoxinucleótidos siguientes como cebadores:

30

5' -

**ACGCGUACUAGUCCGATTAATTAAGGAGGACCATCAATGGCGGACCTGTCAAAGCT**

35

C-3'

40

5' -

**AUGGAGAUCUCUCCGCTAGCGGTTTCGCCGGGCGCCGCTTCGTTGGTCCGCGCGCGGG**

45

**TTTCCC-3'**

y el plásmido pBK6.12 (Ejemplo 5) como plantilla, para dar el plásmido pARLD.

#### 50 Construcción del plásmido pAR11

El segmento del gen de *rapC* de *S. hygroscopicus* (Schwecke, T. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) **92**:7839-7843) del nucleótido 112 al nucleótido 2095, el extremo 5'-final del ADN que codifica el módulo de *rap* 11, se amplifica por PCR empleando el procedimiento CloneAmp con los dos oligodesoxinucleótidos siguientes como cebadores: 5'-AUGGAGAUCUCUCCGCTAGCGATTGTGGGTATGGCG-3' y 5'-ACGCGUACUAGUCCATGCATCTG  
55 CAGCACGGCGGCCTCATCACCGGA-3' y el ADN del bacteriófago recombinante  $\lambda$ -1C (Schwecke, T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) **92**:7839-7843) como plantilla. Se digieren aproximadamente 30-60 ng del producto PCR (2,0 kbp) con la uracilo ADN glicosilasa durante 30 minutos a 37°C en presencia de 25 ng de ADN del vector de  
60 pAMP18, la mezcla se enfría en hielo y se transforma en TG1 recO de *E. coli* y se comprueban las colonias individuales según su contenido de plásmido. El plásmido deseado (4,7 kbp) se identifica por su mapa de restricción y se denomina pAR12.

#### Construcción del plásmido pAR12

65 El segmento del gen de *rapC* de *S. hygroscopicus* (Schwecke, T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) **92**:7839-7843) del nucleótido 7405 al nucleótido 9396, el extremo 3'-final del ADN que codifica el módulo de *rap* 12, se amplifica por PCR empleando el procedimiento CloneAmp con los dos oligodesoxinucleótidos siguientes como cebadores:

## ES 2 337 424 T3

5'-ACGCGUACUAGUCCATGCATTCCCAGGAGCGGCGATCTGTGG-3' y 5'-AUGGAGAUCUCUCCCGCGGCC GCGCTGTCACGCACCAGCTTCAGCAGTGCATC-3' y el ADN del bacteriófago recombinante  $\lambda$ -1C (Schwecke, T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) **92**:7839-7843) como plantilla. Se digieren aproximadamente 30-60 ng del producto PCR (2,0 kbp) con la uracilo ADN glicosilasa durante 30 minutos a 37°C en presencia de 25 ng de ADN del vector de pAMP18, la mezcla se enfría en hielo y se transforma en TGirecO de *E. coli* y se comprueban las colonias individuales según su contenido de plásmido. El plásmido deseado (4,7 kbp) se identifica por su mapa de restricción y se denomina pAR12.

### Construcción de pARTE

10 El segmento de 1,3 kbp del gen *eryAIII*, que se extiende por 132 nucleótidos de 3' del codón de parada de *eryAIII* a un sitio KpnI, y codifica la tioesterasa/ciclasa de terminación de la cadena del extremo C-terminal de DEBS, se amplifica por PCR empleando el procedimiento CloneAmp con los dos oligodesoxinucleótidos siguientes como cebadores: 5'-ACGCGUACUAGUCCCGCGGCCGCGATCCTCGGGCATTCCAGC-3' y 5'-AUGGAGAUCUCUAAG  
15 CATTGGTAACTGTC-3', y el plásmido pEXDB3 (Roberts, G. A. *et al. Eur J. Biochem.* (1993) **214**:305311) como plantilla. Se digieren aproximadamente 30-60 ng del producto PCR (1,3 kbp) con la uracilo ADN glicosilasa durante 30 minutos a 37°C en presencia de 25 ng del ADN del vector de pAMP18, la mezcla se enfría en hielo y se transforma en TG1 recO de *E. coli* y las colonias individuales se comprueban según su contenido de plásmido. El plásmido deseado (4,0 kbp) se identifica por su mapa de restricción y se denomina pARTE.

### Construcción del plásmido pARTr

25 El segmento de 1,3 kbp del plásmido pBR322 que contiene el gen de la resistencia a la tetraciclina se amplifica por el procedimiento CloneAmp con los dos oligodesoxinucleótidos siguientes como cebadores: 5'-ACGC GUACUAGUATCTAGACCATGCATGTTTGACAGCTTATCATC-3' y 5'-AUGGAGAUCUCUATCTAGACCATG  
30 CATGCCGCCGGCTTCCATTCA-3' y el plásmido pBR322 como plantilla. Se digieren aproximadamente 30-60 ng del producto PCR (1,3 kbp) con la uracilo ADN glicosilasa durante 30 minutos a 37°C en presencia de 25 ng de ADN del vector de pAMP18, la mezcla se enfría en hielo y se transforma en TGirecO de *E. coli* y se comprueban las colonias individuales según su contenido de plásmido. El plásmido deseado (4,0 kbp) se identifica por su mapa de restricción y se denomina pARTr.

### Construcción del plásmido pAR1

35 El plásmido pARLD se digiere con NheI e HindIII, y se hibrida al inserto de 2,0 kbp de NheI-HindIII obtenido a partir del plásmido pAR11. La mezcla de hibridación se transforma en TGirecO de *E. coli* y se comprueban las colonias individuales según su contenido de plásmido. El plásmido deseado se identifica por su mapa de restricción y se denomina pAR1.

### Construcción del plásmido pAR2

40 El plásmido pAR1 se lineariza con NsiI y se hibrida con el fragmento de NsiI a partir de pARTr. La mezcla de hibridación se transforma en TGirecO de *E. coli* y se comprueban las colonias individuales según su contenido de plásmido. El plásmido deseado se identifica por su mapa de restricción y se denomina pAR2.

### Construcción del plásmido pAR3

45 El plásmido pAR2 se digiere con SpeI y XbaI y el inserto se hibrida con el plásmido pAR12 que se ha linearizado con SpeI. La mezcla de hibridación se transforma en TGirecO de *E. coli* y se comprueban las colonias individuales según su contenido de plásmido. El plásmido deseado se identifica por su mapa de restricción y se denomina pAR3.

### Construcción del plásmido pAR4

50 El plásmido pAR3 se digiere con NsiI y el vector se hibrida al fragmento NsiI de pARTr, que contiene el gen de resistencia a la tetraciclina. La mezcla de hibridación se transforma en TGirecO de *E. coli* y las colonias individuales, cultivadas en presencia de tetraciclina (12,5  $\mu$ g/ml), se comprueban según su contenido de plásmido. El plásmido deseado se identifica por su mapa de restricción y se denomina pAR4.

### Construcción del plásmido pAR5

55 El plásmido pAR4 se digiere con NotI y XbaI y se hibrida con un fragmento NotI-XbaI obtenido por digestión del plásmido pARTE. La mezcla de hibridación se transforma en TGirecO de *E. coli* y las colonias individuales, cultivadas en presencia de tetraciclina (12,5  $\mu$ g/ml), se comprueban según su contenido de plásmido. El plásmido deseado se identifica por su mapa de restricción y se denomina pAR5.

65

## ES 2 337 424 T3

### Construcción del plásmido pAR5-2

Un segmento de 7,2 kbp del gen de rapC de *S. hygroscopicus* se escinde del cósmido 13 (Schwecke, T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) **92**:7839-7843) usando BstXI y NdeI, se purifica por electroforesis de gel, y se hibrida con pares de plásmido que también se han digerido con BstXI y NdeI. La mezcla de hibridación se transforma en TGirecO de *E. coli* y las colonias individuales, cultivadas en presencia de tetraciclina (12,5 µg/ml), se comprueban según su contenido de plásmido. El plásmido deseado (11,9 kbp) se identifica por su mapa de restricción y se denomina pAR5-2.

### 10 Construcción del plásmido pAR5-3

Un segmento de 3,0 kbp del plásmido pAR5-3 se escinde por digestión con NdeI, se purifica por electroforesis de gel, y se hibrida con el plásmido pAR5-2 que había sido linearizado con NdeI. La mezcla de hibridación se transforma en TGirecO de *E. coli* y las colonias individuales, cultivadas en presencia de tetraciclina (12,5 µg/ml), se comprueban según su contenido de plásmido. El plásmido deseado (14,9 kbp) se identifica por su mapa de restricción y se denomina pAR5-3.

### Construcción del plásmido pAR8

Un fragmento de 12,2 kbp del plásmido pAR5-3 se escinde usando PacI y XbaI, se purifica por electroforesis de gel, y se hibrida con el plásmido pRM52 (Ejemplo 4) que había sido cortado con PacI y XbaI. La mezcla de hibridación se transforma en TGirecO de *E. coli* y las colonias individuales, cultivadas en presencia de tetraciclina (30,3 Ug/ml), se comprueban según su contenido de plásmido. El plásmido deseado (14,9 kbp) se identifica por su mapa de restricción y se denomina pAR8.

25

### Ejemplo 25

#### Construcción de JC2/pAR8 de *S. erythraea* y producción de derivados de TKL

30

##### (i) Construcción

Se usan aproximadamente 5-10 µg de pAR8, aislado de DH10B de *E. coli* (pAR8) para transformar protoplastos de JC2 de *S. erythraea* y se seleccionan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. Una de estas colonias se selecciona y el ADN total se prepara para el análisis de hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado específicamente en la copia cromosómica de la parte del gen eryAIII que codifica la tioesterasa/ciclasa del extremo C-terminal. Esta cepa se denomina JC2/pAR8 de *S. erythraea*.

35

##### (ii) Producción de 2,4-bisnor-3-epi-TKL y (Ac)-2,4-bisnor-3-epi-TKL

40

Se escoge una colonia de JC2/pAR8 de *S. erythraea* y se transfiere al medio sacarosa-succinato suplementado con 50 µg/ml de tioestreptona y se deja crecer a 30°C. Después de 3 días, el caldo se filtra y se extrae dos veces con un volumen igual de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se secan sobre sulfato de sodio anhidro y se concentran bajo presión reducida. La GC-MS del residuo muestra la presencia de 2,4-bisnor-3-epi-TKL (IV, R=E+) y (Ac)-2,4-bisnor-3-epi-TKL (IV, R=Me).

45

### Ejemplo 26

#### 50 Construcción del plásmido pE1A2TE

El plásmido pE1A2TE (como el plásmido pE1A2TE-2 también descrito en este documento) consiste en un plásmido derivado de pT7.7 que contiene un gen de PKS Tipo I híbrido que comprende el módulo de carga de ery, el primer módulo de extensión de la PKS de ery, después el segundo módulo de extensión de la PKS de avr, y la tioesterasa de la PKS de ery. Se construye vía varios plásmidos intermedios como sigue (Figura 15).

55

#### Construcción del plásmido pIG70

El plásmido pVE1446 que contiene una parte de los genes de la PKS de avermectina se obtuvo a partir de ATCC 68250 de *E. coli*. El plásmido pVE1446 se digirió con BamHI y el fragmento de 7,0 kbp entre las coordenadas 6,05 y 13,05 se purificó por electroforesis de gel y se hibridó en el plásmido pUC119 que había sido linearizado con BamHI. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido del plásmido de las colonias individuales. De las dos posibles orientaciones del inserto de BamHI pIG70 se seleccionó aquella en la que se obtenían, cuando se digería con fragmentos PstI, aproximadamente 2,0 y 8,6 kbp y, cuando se digería con fragmentos EcoRI, en la que se obtenían de aproximadamente 5,1 y 5,5 kbp.

65

## ES 2 337 424 T3

### Construcción del plásmido pIG71

El plásmido pVE1446 que contiene una parte de los genes de la PKS de avermectina se obtuvo a partir de ATCC 68250 de *E. coli*. El plásmido pVE1446 se digirió con BamHI y el fragmento de 7,1 kbp entre las coordenadas 13,05 y 20,15 se purificó por electroforesis de gel y se hibridó en el plásmido pUC119 que había sido linearizado con BamHI. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. De las dos orientaciones posibles del inserto de BamHI pIG71 se seleccionó aquella que, cuando se digería con EcoRI y XhoI, se obtenían 2 fragmentos de aproximadamente 5 kbp.

### 10 Construcción del plásmido pIG70ΔPst

El pIG70 se cortó con PstI y se rehibridó. El pIG70ΔPst se aisló después de la transformación en TG1 recO de *E. coli*.

### 15 Construcción del plásmido pIG70ΔEco

El pIG70 se cortó con EcoRI y se rehibridó. El pIG70ΔEco se aisló después de la transformación en TG1 recO de *E. coli*.

### 20 Construcción del plásmido pIG71ΔSac

El pIG71 se cortó con SacI y se rehibridó. El pIG71ΔSac se aisló después de la transformación en TG1 recO de *E. coli*.

### 25 Construcción del plásmido pIGPCRstart

Se usaron 50 pmol de cada uno de los oligonucleótidos sintéticos 8985 (5'-GAGCAGTCGTTCCGAGATCTCGGC TTCGATTCA-3'), que introdujo un sitio BglII, y 9204 (5'-GGGAGGAGATCAGATCCCAGAAGT-3') por PCR para amplificar un producto de 300 bp de 60 ng de pIG70ΔEco. El producto PCR se reparó por el final, se fosforiló y se hibridó en pUC18 que había sido linearizado con SmaI y se desfosforiló. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. La orientación de pIGPCRstart fue identificada por una doble digestión con enzima de restricción con EcoRI y BglII para dar un modelo que incluía un fragmento de 300 bp.

### 35 Construcción del plásmido pIGPCRender

Se usaron 50 pmol de cada uno de los oligonucleótidos sintéticos 8986 (5'-GAGGGAGTCGAACCGAGATCTCG GAACGCGCGG-3'), que introdujo un sitio BglII, y 9205 (5'-GGGGGATCCTGGGGTCCGGCCGGGCAGGGCAA-3') por PCR para amplificar un producto de 440 bp de 60 ng de pIG71ΔSac. El producto PCR se reparó por el final, se fosforiló y se hibridó en pUC18 que había sido linearizado con SmaI y se desfosforiló. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. La orientación de pIGPCRender se identificó por su modelo de digestión con enzima de restricción.

### 45 Construcción del plásmido pIGstart+middle

El plásmido pIGPCRstart se digirió con PstI y el fragmento de 300 bp se purificó por electroforesis de gel y se hibridó en el plásmido pIG70ΔPst que había sido linearizado con PstI y se desfosforiló. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. Los plásmidos que contenían la orientación correcta del inserto de PstI-PstI se identificaron por la secuenciación del ADN.

### 50 Construcción del plásmido pIGAve2Bgl

El plásmido pIGstart+middle se digirió con BamHI y el fragmento de 5,0 kbp se purificó por electroforesis de gel y se hibridó en el plásmido pIGPCRender que había sido cortado con BamHI y se desfosforiló. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. Los plásmidos que contenían la orientación correcta del inserto de BamHI-BamHI se identificaron por la secuenciación del ADN.

### 60 Construcción del plásmido pEIA2TE

El plásmido pIGAve2Bgl se digirió con BglII y el fragmento de 6 kbp se purificó por electroforesis de gel y se hibridó en el plásmido pKW15 (Ejemplo 16) que había sido linearizado con BglII y se desfosforiló. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. Los plásmidos que contenían la orientación correcta del inserto de BglII-BglII se identificaron por digestión por enzima de restricción con EcoRI.

## Ejemplo 27

*Construcción y uso del plásmido pIG2*5 (i) *Construcción*

El plásmido pE1A2TE se digirió con NdeI y XbaI y el fragmento de 11 kbp se purificó por electroforesis de gel y se hibridó en el plásmido pRM52 (Ejemplo 4) que había sido cortado con NdeI y XbaI. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales.

10 (ii) *Construcción de CH999/pIG2 de S. coelicolor*

El plásmido pIG2 que había sido aislado a partir de ET12567 de *E. coli* (MacNeil, D. J. *et al. Gene* (1992) **111**:61-68) se transformó en protoplastos de *S. coelicolor* CH999 de *E. coli* y las colonias estables resistentes a la tioestreptona se aislaron. Se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales y la presencia del plásmido pIG2 se confirmó por su modelo de restricción.

## Ejemplo 28

20 *Construcción del plásmido pIG102*

El plásmido pE1A2TE se digirió con NdeI y XbaI y el fragmento de 11 kbp se purificó por electroforesis de gel y se hibridó en el plásmido pCJR101 (Ejemplo 2) que había sido cortado con NdeI y XbaI. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales.

25

## Ejemplo 29

(i) *Construcción del plásmido pKS22*

30 El plásmido pKS22 es un vector derivado de pNTEP2 que contiene una triquetida sintasa derivada de DEBS1-TE con un dominio de KS2 en lugar del dominio de KS1. El plásmido pKS22 se obtiene vía varios plásmidos intermedios como sigue (Figura 16).

35 *Construcción de los plásmidos pMO07, pMO08 y pMO09*

Para la amplificación por PCR para el plásmido pMO07, se usaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos como cebadores mutagénicos, uno que contiene un sitio HindIII y otro un sitio EcoRV: 5'-GTCTCAAGCTTCGGCAT CAGCGGCACCAA-3' y 5'-CGTGCGATATCCCTGCTCGGCGAGCGCA-3'.

40 Para la amplificación por PCR para el plásmido pMO08, se usaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos como cebadores mutagénicos, uno que contiene un sitio PstI y otro un sitio HindIII: 5'-CATGGCCTGCAGGCTGCCCGGG GAGGTCGACT-3' y 5'-CCCGAAGCTTGACACACCTGCCCGGCGCACCCCGT-3'.

45 Para la amplificación por PCR para el plásmido pMO09, se usaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos como cebadores mutagénicos, uno que contiene un sitio MunI y otro un sitio PstI: 5'-GCGCGCAATTGCGTGCA CATCTCGAT-3' y 5'-CCTGCAGGCCATCGCGACGACCGCGACCGGTTTCGCCG-3'.

La PCR se realizó en pNTEP2 como plantilla usando la ADN polimerasa de Pwo y un ciclo de: 96°C (1 minuto); hibridación a 50°C (3 minutos); y ampliación a 72°C (1 minuto), y 25 ciclos de: 96°C (1 minuto); hibridación a 50°C (1 minuto); y ampliación a 72°C (1 minuto) en presencia de dimetilsulfóxido al 10% (vol/vol). Los productos se repararon por el final y se clonaron en pUC18 digerido con SmaI y la mezcla de hibridación se transformó en DH 10B de *E. coli*. El ADN de plásmido se preparó a partir de las colonias individuales. Los plásmidos deseados para pMO07 (3,8 kbp), pMO08 (3,9 kbp) y pMO09 (4,3 kbp) se identificaron por su modelo de restricción y la secuenciación del ADN.

55 El plásmido pMO08 se digirió con HindIII, y el inserto de 1,2 kbp se clonó en pMO07 que había sido digerido con HindIII. La mezcla de hibridación se transformó en DH 10B de *E. coli*. El plásmido deseado (5,0 kbp) se identificó por su modelo de restricción y se denominó pMO10.

60 El plásmido pMO09 se digirió con PstI, y el inserto de 1,6 kbp se clonó en pMO10 que había sido digerido con PstI. La mezcla de hibridación se transformó en DH 10B de *E. coli*. El plásmido deseado (6,6 kbp) se identificó por su modelo de restricción y se denominó pMO11.

65 El plásmido pMO11 se digirió con MunI y EcoRV, y el fragmento de 3,9 kbp se clonó en pNTEPH (véase más abajo) que había sido digerido con MunI y EcoRV. La mezcla de hibridación se transformó en DK 10B de *E. coli*. El plásmido deseado (13 kbp) se identificó por su modelo de restricción y se denominó pKS22.

El plásmido pNTEPH se obtuvo a partir de pNTEP2 eliminando el sitio HindIII. El pNTEP2 se digirió con HindIII, la proyección 5' se rellenó con ADN polimerasa I del Fragmento Klenow y se rehibridó. El plásmido deseado (13,6 kbp) se identificó por su modelo de restricción.

## ES 2 337 424 T3

### Ejemplo 30

#### (i) Construcción del plásmido pIB018

5 El plásmido pIB018 es un vector derivado de pCJR24 que contiene una triquetida sintasa derivada de DEBS1TE con KS1 en lugar de KS2. El plásmido pIB018 se obtiene vía varios plásmidos intermedios como sigue (Figura 17A).

#### Construcción de los plásmidos pKSA, pKSB y pKSC

10 Para la amplificación por PCR para el plásmido pKSA, se usaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos como cebadores mutagénicos, uno que contiene un sitio PstI y otro un sitio HindIII: 5'-GATGGCCTGCAGGCTGCCCGGC GGTGTGAGCA-3' y 5'-GCCGAAGCTTGAGACCCCGCCCGGCGCGGTTCGC-3'.

15 Para la amplificación por PCR para el plásmido pKSB, se usaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos como cebadores mutagénicos, uno que contiene un sitio EspI y otro un sitio PstI: 5'-TGGCTTCGCTGGCGGACACGCT CAG-3' y 5'-CCTGCAGGCCATGCCGACGATCGCGATCGGCT-3'.

20 Para la amplificación por PCR para el plásmido pKSC, se usaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos como cebadores mutagénicos, uno que contiene un sitio HindIII y otro un sitio BspEI: 5'-GTCAAGCTTCGGGGT GAGCGGGACGAA-3' y 5'-GCGTCCGGACGTGGCTCCAGCA-3'

25 La PCR se realizó en pNTEP2 como plantilla usando la ADN polimerasa de Pwo y un ciclo de: 96° (1 minuto); hibridación a 50° (3 minutos); y ampliación a 72° (1 minuto), y 25 ciclos de: 96°C (1 minuto); hibridación a 50°C (1 minuto); y ampliación a 72°C (1 minuto) en presencia de dimetilsulfóxido al 10% (vol/vol). Los productos se repararon por el final y se clonaron en pUC18 digerido con SmaI y la mezcla de hibridación se transformó en DH 10B de *E. coli*. El ADN de plásmido se preparó a partir de colonias individuales. Los plásmidos deseados para pKSA (4,0 kbp), se identificaron pKSB (4,2 kbp) y pKSC (3,2 kbp) por su modelo de restricción.

30 El plásmido pKSA se digirió con PstI, y el inserto de 1,2 kbp se clonó en pKSB que había sido digerido con PstI. La mezcla de hibridación se transformó en DH 10B de *E. coli*. El plásmido deseado (5,5 kbp) se identificó por su modelo de restricción y se denominó pKSD.

35 El plásmido pKSC se digirió con HindIII, y el inserto de 0,5 kbp se clonó en pKSC que había sido digerido con HindIII. La mezcla de hibridación se transformó en DH 10B de *E. coli*. El plásmido deseado (6,0 kbp) se identificó por su modelo de restricción y se denominó pKSE.

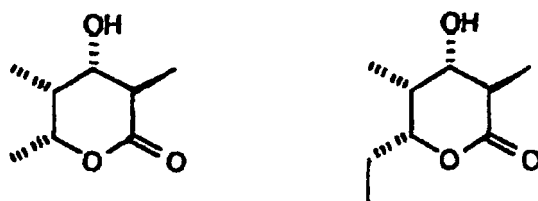
40 El plásmido pKSE se digirió con EspI y BspEI, y el fragmento de 3,3 kbp se clonó en pUCTE que había sido digerido con EspI y BspEI. La mezcla de hibridación se transformó en DH 10B de *E. coli*. El plásmido deseado (13,9 kbp) se identificó por su modelo de restricción y se denominó pIB004.

El plásmido pIB004 se digirió con NdeI y XbaI, y el inserto de 11,2 kbp se clonó en pCJR24 que había sido digerido con NdeI y XbaI. La mezcla de hibridación se transformó en DH 10B de *E. coli*. El plásmido deseado (15,9 kbp) se identificó por su modelo de restricción y se denominó pIB018.

#### 45 (ii) Uso del plásmido pIB018 para la construcción de NRRL2338/pIB018 de *S. erythraea*

Aproximadamente 5 µg del plásmido pIB018 se transforman en protoplastos de NRRL 2338 de *S. erythraea* y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado en el extremo del módulo 2 de eryAI.

50 Se inocula NRRL2338/pIB018 de *S. erythraea* en caldo de soja tríptico que contiene 50 µg/ml de tioestreptona y se deja crecer durante tres días a 30°C. 20 ml de este cultivo de semilla se usan para inocular 400 ml de medio sacarosa-succinato que contienen 50 µg/ml de tioestreptona en un matraz de 2L con un muelle sencillo para reducir la aglutinación, se agita a 300 revoluciones por minuto. Después de 6 días, el caldo se filtró, se ajustó a pH 4 y se extrajo tres veces con un volumen igual de acetato de etilo. El disolvente se eliminó por evaporación. Los productos de triquetida lactona (10 mg/L) se identificaron por GC-MS y RMN. El componente principal fue la δ lactona del ácido (2R, 3S, 4S, 5R)-2,4-dimetil-3,5-dihidroxi-n-hexanoico; también se encontró la δ lactona del ácido (2R, 3S, 4S, 5R)-2,4-dimetil-3,5-dihidroxi-n-heptanoico:



## ES 2 337 424 T3

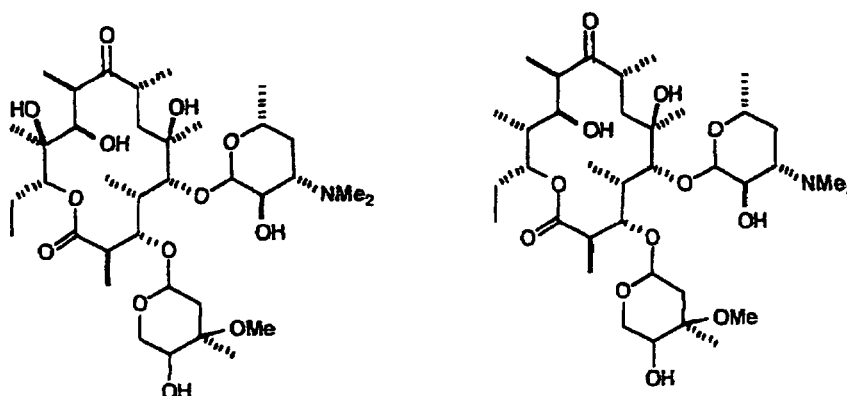
Se identificaron los siguientes macrólidos por HPLC/MS:

5

10

15

20



25

### Ejemplo 31

#### (i) Construcción del plásmido pIB017

El plásmido pIB017 es un vector derivado de pCJR24 que contiene una sintasa triquetida derivada de DEBSITE con KS2 en lugar de KS1 y KS1 en lugar de KS2. El plásmido pIB017 se obtiene vía varios plásmidos intermedios como sigue (Figura 17B).

30

El plásmido pIB004 se digirió con EcoRV y EcoRI, y el fragmento de 7,2 kbp se clonó en pKS22 que había sido digerido con EcoRV y EcoRI. La mezcla de hibridación se transformó en DH 10B de *E. coli*. El plásmido deseado (13,6 kbp) se identificó por su modelo de restricción y se denominó pIB009.

35

El plásmido pIB009 se digirió con NdeI y XbaI, y el inserto de 11,2 kbp se clonó en pCJR24 que había sido digerido con NdeI y XbaI. La mezcla de hibridación se transformó en DH 10B de *E. coli*. El plásmido deseado (15,9 kbp) se identificó por su modelo de restricción y se denominó pIB017.

#### (ii) Construcción de NRRL2338/pIB017 de *S. erythraea*

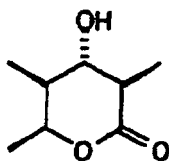
40

Aproximadamente 5  $\mu$ g del plásmido pIB017 se transforman en protoplastos de NRRL 2338 de *S. erythraea* y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado en el extremo del módulo 2 de eryAI.

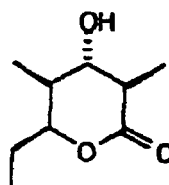
45

Se inocula NRRL2338/pIB017 de *S. erythraea* en caldo de soja tréptico que contiene 50  $\mu$ g/ml de tioestreptona y se deja crecer durante tres días a 30°C. 20 ml de este cultivo de semilla se usan para inocular 400 ml de medio sacarosa-succinato que contienen 50  $\mu$ g/ml de tioestreptona en un matraz de 2L con un muelle sencillo para reducir la aglutinación, se agita a 300 revoluciones por minuto. Después de 6 días, el caldo se filtró, se ajustó a pH 4 y se extrajo tres veces con un volumen igual de acetato de etilo. El disolvente se eliminó por evaporación. El análisis de triquetida lactonas (0,4 mg/L) se hizo por GC-MS, rotación óptica y RMN. Los compuestos aislados se encontró que eran  $\delta$  lactona del ácido (2R, 3S, 4S, 5S)-2,4-dimetil-3,5-dihidroxi-n-hexanoico; y  $\delta$  lactona del ácido (2R, 3S, 4S, 5S)-2,4-dimetil-3,5-dihidroxi-n-heptanoico.

55



60



65



## ES 2 337 424 T3

una columna quirál (Hydrodex- $\beta$ -PM, ID 25 m x 0,25 mm (Machery-Nagel GmbH & CoKG, Alemania)) usando 4 estereoisómeros sintéticos del ácido diquetida como estándares. El compuesto producido se identificó como ácido (2R, 3S)-2-metilo-3-hidroxi-pentanoico.

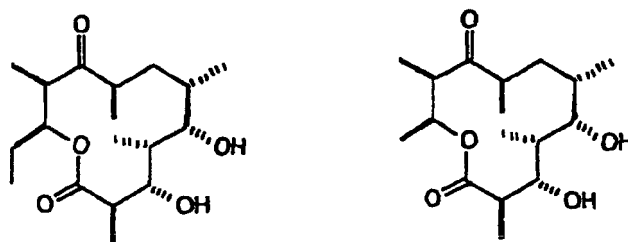
### 5 (iii) Uso del plásmido pIB01S para la construcción de ORF5/pIB015 de *S. erythraea*

Aproximadamente 5  $\mu$ g del plásmido pIB01S se transforman en protoplastos de ORF5 de *S. erythraea* y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado en el módulo 2 de eryAI.

10

Se inocula ORF5/pIB015 de *S. erythraea* en caldo de soja tríplico que contiene 50  $\mu$ g/ml de tioestreptona y se deja crecer durante tres días a 30°C. 20 ml de este cultivo de semilla se usan para inocular 400 ml de medio sacarosa-succinato que contienen 50  $\mu$ g/ml de tioestreptona en un matraz de 2L con un muelle sencillo para reducir la aglutinación, se agita a 300 revoluciones por minuto. Después de 6 días, el caldo se filtró y se extrajo tres veces con un volumen igual de acetato de etilo. El disolvente se analizó por ESMS. Se descubrieron los siguientes compuestos:

15



### Ejemplo 33

#### 30 (i) Construcción del plásmido pIB016

El plásmido pIB016 es un vector derivado de pCJR24 que contiene una sintasa diquetida con LD, KS2, AT2, KR2, ACP2/6 y TE. El plásmido pIB016 se obtiene vía varios plásmidos intermedios como sigue (Figura 18).

35

El plásmido pIB009 se digirió con HindIII para eliminar un fragmento de 4,4 kbp, y se rehibridó. La mezcla de hibridación se transformó en DH 10B de *E. coli*. El plásmido deseado (9,2 kbp) se identificó por su modelo de restricción y se denominó pIB012.

40

El plásmido pIB012 se digirió con NdeI y XbaI, y el inserto de 6,8 kbp se clonó en pCJR24 que había sido digerido con NdeI y XbaI. La mezcla de hibridación se transformó en DH 10B de *E. coli*. El plásmido deseado (9,2 kbp) se identificó por su modelo de restricción y se denominó pIB016.

#### (ii) Uso del plásmido pIB016 para la construcción de ORF5/pIB016 de *S. erythraea*

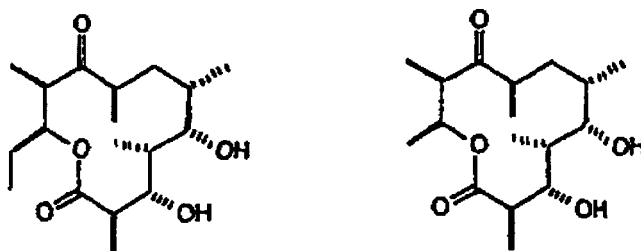
45

Aproximadamente 5  $\mu$ g del plásmido pIB016 se transforman en protoplastos de ORF5 de *S. erythraea* y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado en el módulo 2 de eryAI.

50

Se inocula ORF5/pIB016 de *S. erythraea* en caldo de soja tríplico que contiene 50  $\mu$ g/ml de tioestreptona y se deja crecer durante tres días a 30°C. 20 ml de este cultivo de semilla se usan para inocular 400 ml de medio sacarosa-succinato que contienen 50  $\mu$ g/ml de tioestreptona en un matraz de 2L con un muelle sencillo para reducir la aglutinación, se agita a 300 revoluciones por minuto. Después de 6 días, el caldo se filtró y se extrajo tres veces con un volumen igual de acetato de etilo. El extracto se analizó por ESMS. Se descubrieron los siguientes compuestos:

55



## Ejemplo 34

*Construcción del plásmido pJLK15*

5 El plásmido pJLK15 es un plásmido basado en pCJR24 que contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de ery, el primer y el segundo módulos de extensión de la PKS de ery y la tioesterasa de terminación de cadena de ery salvo que el segmento de ADN entre el extremo de la aciltransferasa y el principio de ACP del segundo módulo de extensión ery ha sido sustituido por el segmento equivalente del módulo 13 de la PKS de rap. Se construyó vía

10

*Construcción del plásmido pJLK01*

15 Se amplificó el fragmento de ADN de aproximadamente 0,46 kbp del gen eryAI de *S. erythraea* por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: 5'-GGAGTACTGCGAGGGCGTGGGCAT-3' y 5'-CACCTAG GACCGCTTCCCAGTCGACC-3' y el plásmido pNTEPH como plantilla. El producto PCR se trata con la polinucleótido T4 quinasa y luego se hibrida con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJLK01 se identificó por su modelo de restricción y secuenciación de ADN.

20

*Construcción del plásmido pJLK08*

25 Se amplificó el fragmento de ADN de aproximadamente 1,47 kbp del gen eryKI de *S. erythraea* por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: 5'-TACCTAGGCCGGGCGGACTGGTCGACCTGCCGGGTT-3' y 5'-ATCCTCAGGCTCTCCGTCCTCCGGTCTCC-3' y el plásmido pNTEPH como plantilla. El producto PCR se trata con la polinucleótido T4 quinasa y luego se hibrida con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJLK08 se identificó por su modelo de restricción y secuenciación de ADN.

30

*Construcción del plásmido pJLK09*

35 Se amplificó el fragmento de ADN de aproximadamente 1,12 kbp del gen eryAI de *S. erythraea* por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: 5'-TACCTGAGGGACCGGCTAGCGGGTCTGCCGCGTG-3' y 5'-CTTCTAGACTATGAATTCCTCCGCCAGC-3' y el plásmido pNTEPH como plantilla. El producto PCR se trata con la polinucleótido T4 quinasa y luego se hibrida con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJLK09 se identificó por su modelo de restricción y secuenciación de ADN.

40

*Construcción del plásmido pJLK10*

45 El plásmido pJLK08 se digirió con PstI y Bsu36I y el inserto se hibridó con el plásmido pJLK09 que había sido digerido con PstI y Bsu36I. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJLK10 se identificó por su modelo de restricción.

*Construcción del plásmido pJLK11*

50 El plásmido pJLK01 se digirió con PstI y AvrII y el inserto se hibridó con el plásmido pJLK10 que había sido digerido con PstI y AvrII. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJLK11 se identificó por su modelo de restricción.

55

*Construcción del plásmido pJLK12*

60 El plásmido pJLK11 se digirió con ScaI y el fragmento de 4,7 kbp se hibridó con el plásmido pCJR34 que había sido digerido con ScaI. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJLK12 se identificó por su modelo de restricción. El pCJR34 se construyó del modo siguiente. El pNTEP2 se digirió con NdeI y XbaI y se clonó en pUC19 que había sido previamente digerido con NdeI y XbaI. El plásmido deseado pCJR34 se identificó por su modelo de restricción.

*Construcción del plásmido pJLK13*

65 El plásmido pJLK12 se digirió con NdeI y XbaI y el fragmento de 11,2 kbp se hibridó con el plásmido pCJR24 que había sido digerido con NdeI y XbaI. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJLK13 se identificó por su modelo de restricción.

## ES 2 337 424 T3

### Construcción del plásmido pJLK14

El ADN de aproximadamente 3,3 kbp del gen rapC de *S. hygroscopicus* que codificaba el bucle de reducción del módulo 13 se amplificó por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: 5'-CGCCTAGGCACCAC  
5 CACAACCCGGGTACTGGACC-3' y 5'-TAGCTAGCCGGGCGCTCAGGGGCTGCGAGCCGACCT-3' y el cósmido  
cos 31 (Schwecke, T. *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:7839-7843) como plantilla. El producto PCR se  
trata con la polinucleótido T4 quinasa y luego se hibrida con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante  
digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar  
DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJLK14  
10 se identificó por su modelo de restricción y secuenciación de ADN.

### Construcción del plásmido pJLK15

El plásmido pJLK14 se digirió con AvrII y NheI y el fragmento de 3,3 kbp se hibridó con el plásmido pJLK13  
15 que había sido digerido con AvrII y NheI. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se  
comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJLK15 se identificó por su  
modelo de restricción.

### 20 Ejemplo 35

#### Uso del plásmido pJLK15 para la construcción de JC2/pJLK15

Aproximadamente 5 µg del plásmido pJLK15 se transforman en protoplastos de JC2 de *S. erythraea* y se aíslan las  
25 colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por  
hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado en el TE. El JC2/pJLK15 se inocula en caldo  
de soja triptico que contiene 50 µg/ml de tioestreptona y se deja crecer durante tres días a 30°C. 20 ml de este cultivo  
de semilla se usan para inocular 400 ml de medio sacarosa-succinato que contienen 50 µg/ml de tioestreptona en un  
matraz de 2L con un muelle sencillo para reducir la aglutinación, se agita a 300 revoluciones por minuto. Después  
30 de 6 días, el caldo se filtró, se ajustó a pH 3 y se extrajo tres veces con un volumen igual de acetato de etilo. El  
disolvente se eliminó por evaporación y el residuo se disolvió en metanol (5 ml) y se analizó mediante espectroscopia  
de masas por electropulverización. Los productos principales se identificaron como δ-lactona del ácido (2R, 4R, 5R)-  
2,4-dimetil-5-hidroxi-hexanoico (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>; MH<sup>+</sup>: calc. 143,1072, encontrado 143,110; MNa<sup>+</sup>: calc. 165,0891, encon-  
trado 165,093) y como δ-lactona del ácido (2R, 4R, 5R)-2,4-dimetil-5-hidroxi-n-heptanoico (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>; MH<sup>+</sup>: calc.  
35 156,1150, encontrado 156,118; MNa<sup>+</sup>: calc. 178,0970, encontrado 178,099).

### Ejemplo 36

#### 40 Construcción del plásmido pJLK18

El plásmido pJLK18 es un plásmido basado en pCJR24 que contiene un gen PKS que comprende el módulo de  
carga de ery, el primer y el segundo módulo de extensión de la PKS de ery y la tioesterasa terminadora de cadena de  
ery salvo que el segmento de ADN entre el final de la aciltransferasa y el principio de ACP del segundo módulo de  
45 extensión ery ha sido sustituido por el segmento equivalente del módulo 4 de la PKS de rap. Se construyó vía varios  
plásmidos intermedios como sigue (Figura 20).

#### Construcción del plásmido pJLK16

Se amplificó por PCR el fragmento de ADN de aproximadamente 2,8 kbp del gen rapA de *S. hygroscopicus* que co-  
50 dicaba el bucle de reducción del módulo 4 usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: 5'-CCTAGGCAC  
CACCACGGCCCGGTGCTGGACCTT-3' y 5'-CCTCAGGCTGTCACCGGTAGAGGCGGCCCT-3' y el cósmido  
cos 25 (Schwecke, T. *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:7839-7843) como plantilla. El producto PCR se  
trata con la polinucleótido T4 quinasa y luego se hibrida con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante  
55 digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar  
DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJLK16  
se identificó por su modelo de restricción y secuenciación de ADN.

#### Construcción del plásmido pJLK17

El plásmido pJLK16 se digirió con AvrII y Bsu36I y el fragmento de 2,8 kbp se hibridó con el plásmido pJLK12  
que había sido digerido con AvrII y Bsu36I. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y  
se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJLK17 se identificó por su  
65 modelo de restricción.

## ES 2 337 424 T3

### Construcción del plásmido pJLK18

El plásmido pJLK17 se digirió con NdeI y XbaI y el fragmento de 11,2 kbp se hibridó con el plásmido pCJR24 que había sido digerido con NdeI y XbaI. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJLK18 se identificó por su modelo de restricción.

### Ejemplo 37

#### Uso del plásmido pJLK18 para la construcción de JC2/pJLK18

Aproximadamente 5 µg del plásmido pJLK18 se usan para transformar protoplastos de JC2 de *S. erythraea* y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado en el TE. El JC2/pJLK18 de *S. erythraea* se inocula en caldo de soja tréptico que contiene 50 µg/ml de tioestreptona y se deja crecer durante tres días a 30°C. 20 ml de este cultivo de semilla se usan para inocular 400 ml de medio sacarosa-succinato que contienen 50 µg/ml de tioestreptona, 0,1 mg/ml de ácido 4-pentinoico y 0,1 mg/ml de ácido 3-tetradecilsulfanil-propionico en un matraz de 2L con un muelle sencillo para reducir la aglutinación, se agita a 300 revoluciones por minuto. Después de 6 días, el caldo se filtró, se ajustó a pH 3 y se extrajo tres veces con un volumen igual de acetato de etilo. El disolvente se eliminó por evaporación y el residuo se disolvió en metanol (5 ml) y se analizó mediante espectroscopia de masas por electropulverización. Los productos principales se identificaron como ácido (E, 4R, 5R)-2,4-dimetil-5-hidroxi-n-2-hexenoico (C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>; MH<sup>+</sup>: calc. 159,1021, encontrado 159,098; MNa<sup>+</sup>: calc. 181,0841, encontrado 181,079) y ácido (E, 4R, 5R)-2,4-dimetil-5-hidroxi-n-2-heptenoico (C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>; MH<sup>+</sup>: calc. 173,1178, encontrado 173,118; MNa<sup>+</sup>: calc. 195,0997, encontrado 195,104).

### Ejemplo 38

#### Construcción del plásmido pJLK21 (Figura 21)

#### Construcción del plásmido pJLK19

Para la amplificación por PCR de un fragmento de ADN de aproximadamente 1,3 kbp para el plásmido pJLK19, se usaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos como cebadores: 5'-GTCAAGCTTCGGGGTGAGCGGGACGAA-3' y 5'-ATCCTAGGACCGCTTCCCAGTCGACCGCGACA-3'. La PCR se realizó en pNTEPH como plantilla. El producto PCR se trata con la polinucleótido T4 quinasa y luego se hibrida con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJKL19 se identificó por su modelo de restricción.

#### Construcción del plásmido pJLK20

El plásmido pIBO11 se digirió con HindIII y NdeI y el fragmento de 2,9 kbp se clonó en pJKL19 que había sido digerido con HindIII y NdeI. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJKL20 se identificó por su modelo de restricción.

#### Construcción del plásmido pJLK21

El plásmido pJKL20 se digirió con AvrII y NdeI clonado en pJLK15 que había sido digerido con AvrII y NdeI. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJKL21 se identificó por su modelo de restricción.

### Ejemplo 39

#### Uso del plásmido pJKL21 para la construcción de JC2/pJKL21

Aproximadamente 5 µg del plásmido pJKL21 se transforman en protoplastos de JC2 y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado en la tioesterasa. El JC2/pJKL21 se inocula en caldo de soja tréptico que contiene 50 µg/ml de tioestreptona y se deja crecer durante tres días a 30°C. 20 ml de este cultivo de semilla se usan para inocular 400 ml de medio sacarosa-succinato que contienen 50 µg/ml de tioestreptona, 0,1 mg/ml de ácido 4-pentinoico y 0,1 mg/ml de ácido 3-tetradecilsulfanil-propionico en un matraz de 2L con un muelle sencillo para reducir la aglutinación, se agita a 300 revoluciones por minuto. Después de 6 días, el caldo se filtró, el pH se ajustó a pH 3 y se extrajo 3 veces con un volumen igual de acetato de etilo. El disolvente se eliminó por evaporación y el residuo se disolvió en metanol (5 ml) y se analizó mediante espectroscopia de masas

## ES 2 337 424 T3

por electropulverización. Los productos principales se identificaron como ácido (2R)-2-metil-butanoico ( $C_5H_{10}O_2$ ;  $MH^+$ : calc. 103,0759, encontrado 103,071;  $MNa^+$ : calc. 125,0578, encontrado 125,052) y como ácido (2R)-2-metil-pentanoico.

### 5 Ejemplo 40

#### *Construcción del plásmido pJLK22*

10 El plásmido pJKL20 se digirió con AvrII y NdeI clonado en pJKL18 que había sido digerido con AvrII y NdeI. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pJKL22 se identificó por su modelo de restricción.

### 15 Ejemplo 41

#### *Uso del plásmido pJKL22 para la construcción de JC2/pJKL22 de S. erythraea*

20 Aproximadamente 5  $\mu g$  del plásmido pJKL22 se transforman en protoplastos de JC2 y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado en la tioesterasa.

25 El JC2/pJKL22 se inocular en caldo de soja tríplico que contiene 50  $\mu g/ml$  de tioestreptona y se deja crecer durante tres días a 30°C. 20 ml de este cultivo de semilla se usan para inocular 400 ml de medio sacarosa-succinato que contienen 50  $\mu g/ml$  de tioestreptona, 0,1 mg/ml de ácido 4-pentinoico y 0,1 mg/ml de ácido 3-tetradecilsulfanil-propionico en un matraz de 2L con un muelle sencillo para reducir la aglutinación, se agita a 300 revoluciones por minuto. Después de 6 días el caldo se filtró, el pH se ajustó a pH 3 y se extrajo 3 veces con un volumen igual de acetato de etilo. El disolvente se eliminó por evaporación y el residuo se disolvió en metanol (5 ml) y se analizó mediante espectroscopia de masas por electropulverización. Los productos principales se identificaron como ácido (E)-2-metil-butanoico ( $C_5H_8O_2$ ;  $MH^+$ : calc. 101,0602, encontrado 101,062;  $MNa^+$ : calc. 123,0422, encontrado 123,043) y ácido (E)-2-metil-pentenoico ( $C_6H_{10}O_2$ ;  $MH^+$ : calc. 115,0759, encontrado 115,077;  $MNa^+$ : calc. 137,0578, encontrado 137,058).

### 35 Ejemplo 42

Para la construcción del plásmido pKR1-0, un derivado de pCJR24 que codifica una sintasa cetolactona, se construyeron diversos plásmidos intermedios (Figura 22).

#### 40 *Construcción del plásmido p37*

El segmento de 1,4 kbp del plásmido pNTEP2 que contenía del nucleótido 9838 al 11214 (que codificaba los aminoácidos del 3279 al final de DEBSI-TE) se amplifica por PCR con los dos oligonucleótidos sintéticos siguientes como cebadores 5'-GCCACTAGTGTGGCGTGGGGGCTGTGGG-3' y 5'-TGAATCCCTCCGCCAGCCAGGCGTCCG AT-3' y el plásmido pNTEP2 como plantilla. El producto PCR se reparó por el final y se hibridó con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado p37, en el que fue introducido un sitio SpeI en el extremo 5' final de este fragmento, se identificó por su modelo de restricción y por secuenciación de ADN.

#### 50 *Construcción del plásmido p37N*

El plásmido p37 se digirió con EcoRI y KpnI y el fragmento de 1,4 se hibridó a pNTEP2 previamente digerido con EcoRI y KpnI. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado p37N se identificó por su modelo de restricción.

#### *Construcción del plásmido pSCA7*

60 El segmento de ADN de 1,1 kbp del gen eryAI de *S. erythraea* que se extiende desde el nucleótido 8202 al nucleótido 9306 se amplificó por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: 5'-CCTGGAGTACTGC GAGGGCGTG-3' y 5'-CTGACTAGTGGCGGTGACGTGGGCGGGGAAA-3' y el plásmido pNTEP2 como plantilla. El producto PCR se reparó por el final y se hibridó con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobaron las colonias individuales según su contenido de plásmido. El plásmido deseado pSCA7, en el que un sitio SpeI se ha introducido en el extremo 3' final de este producto PCR, se identificó por su modelo de restricción y por la secuenciación de ADN.

## ES 2 337 424 T3

### Construcción del plásmido pSH

El plásmido p37N se digirió con SpeI e HindIII y el fragmento de 1,4 kbp se hibridó con el plásmido pSCA7 previamente digerido con SpeI e HindIII. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pSH se identificó por su modelo de restricción.

### Construcción del plásmido pUCTE

El plásmido pNTEP2 se digirió con BglII e HindIII y el inserto de 11,2 kbp se hibridó al plásmido pUC18 digerido con BamHI e HindIII. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pUCTE se identificó por su modelo de restricción.

### Construcción del plásmido pUC1-0

El fragmento de restricción de 3,9 kbp de ScaI de pUCTE se sustituyó por el fragmento de restricción de 3,4 kbp de ScaI de pSH. El plásmido deseado pUC1-0 se identificó por su modelo de restricción.

### Construcción del plásmido pKR1-0

El NdeI de 10,7 kbp y el fragmento de restricción de XbaI de pUC1-0 se hibridó a pCJR24 digerido con NdeI y XbaI. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y las colonias individuales fueron comprobadas según su contenido de plásmido. El plásmido deseado pKR1-0 se identificó por su modelo de restricción.

### Ejemplo 43

#### Construcción y uso de JC2/pKR1-0 de *S. erythraea*

##### (i) Construcción

Aproximadamente 5  $\mu$ g del plásmido pKR1-0 se usaron para transformar protoplastos de JC2 de *S. erythraea* y se aislaron las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtuvo el ADN total y se analizó por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se había integrado específicamente en la parte del gen eryAIII que codificaba la tioesterasa/ciclasa del extremo C-terminal, mediante recombinación homóloga. Dicho clon se seleccionó y se denominó JC2/pKR1-0 de *S. erythraea*.

##### (ii) Producción de triquetida lactonas usando JC2/pKR1-0 de *S. erythraea*

Se inoculó JC2/pKR1-0 de *S. erythraea* en medio sacarosa-succinato que contiene 10  $\mu$ g/ml de tioestreptona y se deja crecer durante cuatro días a 30°C. Después de este tiempo, el caldo se filtra para eliminar micelios y luego se extrae dos veces con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se analizan por cromatografía de gases, espectrometría de masas y RMN y se encuentra que los productos principales eran  $\delta$ -lactona del ácido (2R, 4R, 5R)-2,4-dimetil-3-ceto-5-hidroxi-n-hexanoico y  $\delta$ -lactona del ácido (2R, 4R, 5R)-2,4-dimetil-3-ceto-5-hidroxi-n-heptanoico con rendimientos totales de 20 mg/L para cada lactona.

### Ejemplo 44

Para la construcción de una cepa de *S. erythraea* que produce quetolidas, la construcción del plásmido pKETO requirió la construcción de los siguientes plásmidos intermedios (Figura 23).

#### Construcción de pI-0

El segmento de 1,9 kbp de pUCI-0 del nucleótido 8715 al 10645 se amplificó por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: 5'-CCCCTGCAGCCGGACCGCACCCCTCGTGACGA-3' y 5'-CTTCTAGAC TATGAATTCCTCCGCCAGC y el ADN de pUCI-0 como plantilla. El producto PCR se reparó por el final y se hibridó con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado, denominado PI-0, se identificó por análisis de restricción y secuenciación de ADN.

#### Construcción de pX3

El segmento de 60bp de eryAIII del nucleótido 7006 al 7066 se amplificó por PCR usando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: 5'-GGCGGAACGTCTTCCCGCGGCACCT-3' y 5'-CCCCTGCAGCCAGTACCGCTG GGGCTCGAA-3' y pEXDB3 (Roberts, G. A., et al. (1993) *Eur. J. Biochem.* **214**:305-311) como plantilla. El producto PCR se reparó por el final y se hibridó con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con

## ES 2 337 424 T3

SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado, denominado PD3P, se identificó por análisis de restricción y secuenciación de ADN.

### 5 Construcción de pT3

El fragmento de restricción de 0,1 kbp de EcoRI y PstI de pX3 se hibridó con pT7-18 digerido con EcoRI y PstI. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado, denominado PT3, se identificó por análisis de restricción.

10

### Construcción de pT31-0

El fragmento de 1,9 kbp de PstI y pI-0 se hibridó a pT3 digerido con PstI. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado, denominado PT31-0, se identificó mediante análisis de restricción.

15

### Construcción de pD31-0

El fragmento de restricción de 3,3 kbp de XmnI de pEXDB3 (Roberts, G. A., *et al.* (1993) *Eur. J. Biochem.* **214**:305311) se substituyó por el fragmento de restricción de 2,7 kbp de XmnI de pT31-0. El plásmido deseado pD31-0 se identificó mediante análisis de restricción.

20

### Construcción de pKETO

El plásmido pD31-0 se digirió con BglII y el fragmento de 11,3 kbp se hibridó a pIJ702 que había sido linearizado mediante digestión con BglII. La mezcla de hibridación se usó para transformar DH10B de *E. coli* y las colonias individuales se comprobaron según su contenido de plásmido. El plásmido deseado, denominado PKETO, se identificó mediante análisis de restricción.

25

### Ejemplo 45

30

### Construcción de NRRL2338/pKETO de *S. erythraea*

Aproximadamente 5  $\mu$ g del plásmido pKETO aislado de DH10B de *E. coli* se usaron para transformar protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea* y se aislaron las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtuvo el ADN total y se analizó por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se había integrado específicamente en el gen eryAIII mediante recombinación homóloga. Dicho clon se seleccionó y se denominó NRRL2338/pKETO de *S. erythraea*.

35

### (ii) Producción de *quetolidas* usando NRRL2338/pKETO de *S. erythraea*

Se inoculó NRRL2338/pKETO de *S. erythraea* en medio sacarosa-succinato que contenía 10  $\mu$ g/ml de tioestreptona y se dejó crecer durante cuatro días a 30°C. Después de este tiempo, el caldo se filtra para eliminar los micelios, el sobrenadante se ajusta a pH 9,5 y luego se extrae dos veces con volúmenes iguales de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se evaporaron hasta secarse, el residuo se llevó a metanol (5 mL) y luego se analizó por HPLC y MS por electropulverización. Se encontró que el producto principal es la 3-quetolida esperada con un rendimiento aproximado de 10 mg/L. El análisis del espectro de masas por electropulverización muestra que el aducto de protón para este compuesto muestra una masa MH<sup>+</sup> de 558,4, que se confirmó por análisis de masas exacto; MH<sup>+</sup> requiere 558,36418 C<sub>29</sub>H<sub>52</sub>O<sub>9</sub>N, observado 558,36427.

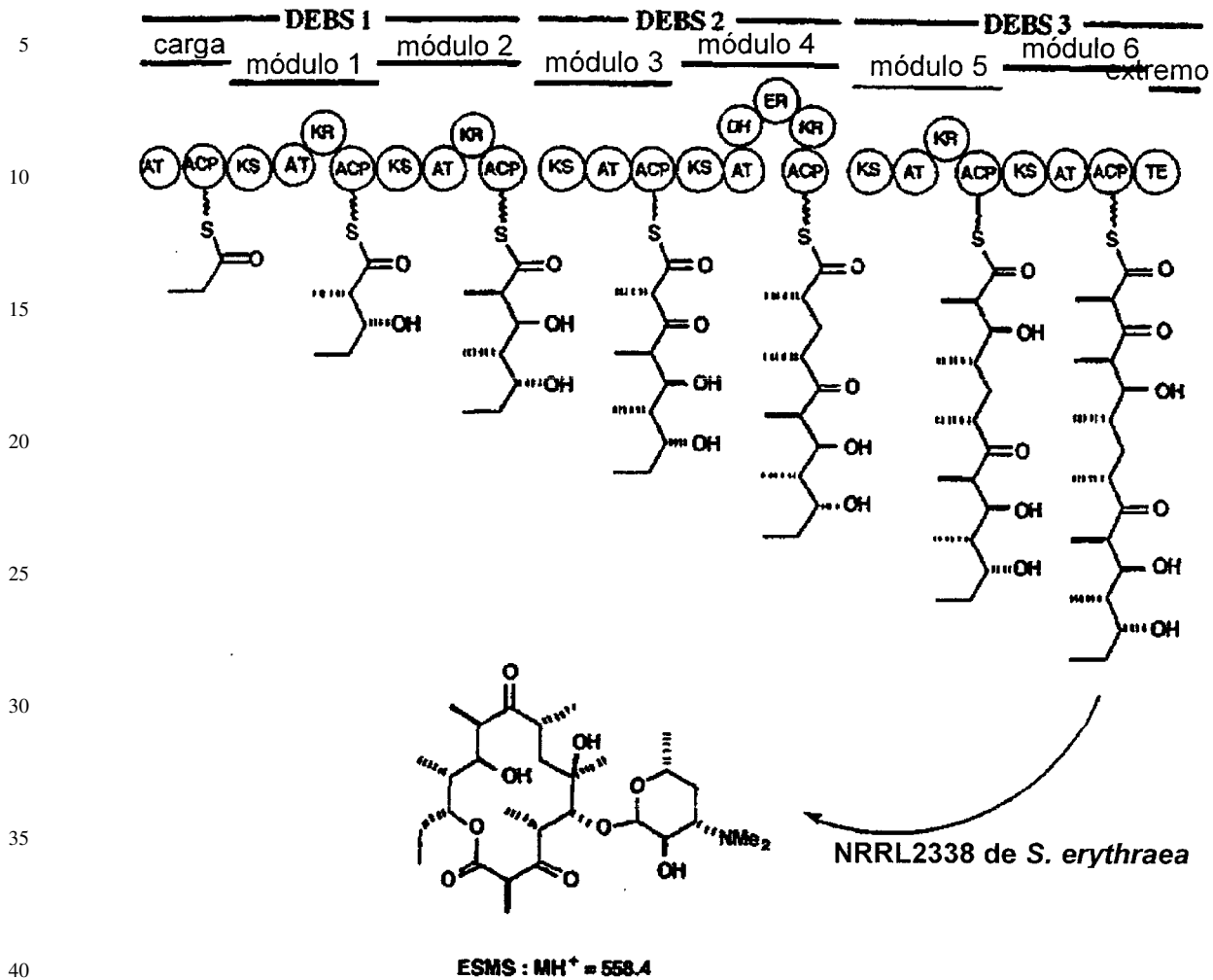
40

55

60

65

Síntesis de quetolidas por  $\Delta KR6$



$C_{29}H_{52}O_9N$  requiere 558,36418; encontrado 556,36427

45 Ejemplo 47

Construcción del plásmido pMO7

50 El plásmido pMO7 (como el plásmido pM0107 también descrito en este documento) es un plásmido basado en SCP2\* que contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de ery, el primer y segundo módulo de extensión de la PKS de ery y tioesterasa terminadora de cadena de ery, salvo que el segmento de ADN que codifica la metilmalonil-CoA:ACP aciltransferasa dentro del primer módulo de extensión de ery ha sido específicamente sustituido por el ADN que codifica la malonil-CoA:ACP aciltransferasa del módulo 13 de la PKS de rap. Se construyó vía varios plásmidos intermedios como sigue (Figura 24).

55 Construcción del plásmido pMO1

60 El segmento de ADN de aproximadamente 1,3 kbp del gen eryAI de *S. erythraea* que se extiende desde el nucleótido 1948 al nucleótido 3273 de eryAI (Donadio, S. *et al. Science* (1991) 252:675-679) se amplificó por PCR empleando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: 5'-CATGCTCGAGCTCTCCTGGGAAGT-3' y 5'-CAACCCTGGC CAGGGAAGACGAAGACGG-3', y el plásmido pNTEP2 (Ejemplo 5) como plantilla. El producto PCR se reparó por el final y se hibridó con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pMO1 (3,9 kbp), en el que el sitio StuI que linda con el inserto está adyacente al sitio HindIII en el polienlazante, se identificó por su modelo de restricción.

65

## ES 2 337 424 T3

### Construcción del plásmido pMO2

El segmento de ADN de aproximadamente 0,85 kbp del gen rapA de *S. hygroscopicus*, que se extiende desde el nucleótido 1643 al nucleótido 2486 de rapA, se amplificó por PCR empleando como cebadores los oligonucleótidos siguientes: 5'-TTCCCTGGCCAGGGGTCGCAGCGTG-3' y 5'-CACCTAGGACCGCGGACCACTCGAC-3', y el ADN del bacteriófago recombinante -1E (Schwecke, T. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) **92**:7839-7843) como plantilla. El producto PCR se reparó por el final y se hibridó con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pMO2 (3,5 kbp) se identificó por su modelo de restricción.

### Construcción del plásmido pMO3

El segmento de ADN de aproximadamente 1,7 kbp del gen eryAI de *S. erythraea* que se extiende desde el nucleótido 4128 al nucleótido 5928 de eryAI, se amplificó por PCR empleando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: 5'-TGGCCAGGGAGTCGGTGCACCTAGGCA-3' y 5'-GCCGACAGCGAGTCGACGCCGAGTT-3' y el plásmido pNTEP2 como plantilla. El producto PCR se reparó por el final y se hibridó con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pMO3 (4,4 kbp), en el que los sitios Ball y AvrII están adyacentes al sitio HindIII del polienlazante, se identificó por su modelo de restricción.

### Construcción del plásmido pMO4

El plásmido pMO1 se digirió con HindIII y Ball y el inserto de 1,3 kbp se hibridó con el plásmido pMO3 que había sido digerido con HindIII y Ball. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pMO4 (5,6 kbp) se identificó por su modelo de restricción.

### Construcción del plásmido pMO5

El plásmido pMO4 se digirió con StuI y el inserto de 3,0 kbp se hibridó con el plásmido pNTEP2 que había sido digerido con StuI y el vector se purificó por electroforesis de gel para eliminar el inserto de 3,8 kbp. La mezcla de hibridación se transformó en TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pMO5 (12,8 kbp) se identificó por su modelo de restricción.

### Construcción del plásmido pMO6

El plásmido pMO2 se digirió con Ball y AvrII y el inserto se hibridó con el plásmido pMO5 que había sido digerido con Ball y AvrII. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pMO6 (13,5 kbp) se identificó por su modelo de restricción.

### Construcción del plásmido pMO7

El plásmido pMO6 se digirió con NdeI y XbaI y el inserto se hibridó con el plásmido pRM52 (Ejemplo 4) que había sido digerido con NdeI y XbaI y se purifica por electroforesis de gel. La mezcla de hibridación se transformó en TG1 recO de *E. coli* y se comprobaron las colonias individuales según su contenido de plásmido. El plásmido deseado pMO7 (también denominado pRMAT2) se identificó por su modelo de restricción.

### Ejemplo 48

#### Construcción de CH999/pMO7 de *S. coelicolor* y producción de derivados de TKL

##### (i) Construcción

El plásmido pMO7 que había sido aislado de ET12567 de *E. coli* (MacNeil, D. J. *et al. Gene* (1992) **111**:61-68) se transformó en protoplastos de CH999 de *S. coelicolor* y se aislaron las colonias estables resistentes a la tioestreptona. Se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales y la presencia del plásmido pMO7 se confirmó por su modelo de restricción.

##### (ii) Producción y aislamiento de 4-nor-TKL y (Ac) 4-nor-TKL usando CH999/pMO7 de *S. coelicolor*

Se inoculó CH999/pMO7 de *S. coelicolor* en medio YEME que contenía 50 µg/ml de tioestreptona y se dejó crecer durante cinco días a 28-30°C. Después de este tiempo, el caldo se filtró para eliminar los micelios y el pH se ajustó a pH 3. El caldo se extrajo dos veces con dos volúmenes de acetato de etilo y los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con un volumen igual de cloruro de sodio saturado, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y el acetato

## ES 2 337 424 T3

de etilo se eliminó bajo presión reducida, para dar el producto a granel de aproximadamente 200 mg. Este se digirió con 2 ml de metanol y se mezcló con 0,5 g del gel de sílice seco y luego se sometió a cromatografía súbita en una columna del mismo material (1 cm x 15 cm). La columna se eluyó con éter de dietilo, y se recuperaron fracciones de 10 ml cada una. Las fracciones 4-8 se reunieron y el éter de dietilo se evaporó para dejar aproximadamente 10 mg de residuo aceitoso que contenía los compuestos del interés. Éstos fueron purificados después por hplc en una columna de fase inversa de octadecil-sílice (10 mm x 25 cm) eluída a un caudal de 2 ml/minuto primero con una mezcla isocrática de agua/metanol 75:25 (vol/vol) durante cinco minutos, luego con un gradiente lineal de metanol creciente, alcanzando agua/metanol 55/45 (vol/vol) después de 30 minutos. Después de aproximadamente 11 minutos, las fracciones se reunieron conteniendo, como componente minoritario, (Ac) 4-nor-TKL ( $R_1=Me$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=Me$ ) y después de aproximadamente 18 minutos las fracciones se reunieron conteniendo, como componente principal, 4-nor-TKL ( $R_1=Me$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=Et$ ).

El espectro  $^1H$  de 4-nor-TKL se determinó usando un espectrómetro RMN AM-400 de Bruker. Encontrado: H (400 MHz,  $CDCl_3$ ) 4,18 (1H, dtd, 11,8, 6,1, 2,9 Hz, H-5), 3,75 (1H, ddd, 11,0, 10,0, 4,0 Hz, H-3), 2,35 (1H, dq, 10,0, 7,0 Hz, H-2), 2,20 (1H, ddd, 13,3, 4,0, 2,9 Hz, H-4eq), 1,6-1,88 (3H, m, 2xH-6, H-4ax), 1,41 (1H, d, 7,0 Hz,  $CH_3-3'$ ), 1,01 (1H, t, 7,5 Hz,  $CH_3-7$ ) ppm.

El espectro de RMN  $^{13}C$  de 4-nor-TKL también se determinó (100 MHz,  $CDCl_3$ ): 173,3 (C-1), 77,7 (C-5), 70,4 (C-3), 45,1 (C2), 37,7 (C-4), 28,8 (C-6), 13,5 (C-3'), 9,1 (C-7).

### Ejemplo 49

#### *Construcción del plásmido pMO107 y producción de derivados de TKL*

##### (i) Construcción

El plásmido pMO6 se digirió con NdeI y XbaI y el inserto se hibridó con el plásmido pCJR101 (Ejemplo 2) que había sido digerido con NdeI y XbaI y se purificó por electroforesis de gel. La mezcla de hibridación se transformó en TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pMO107 se identificó por su modelo de restricción.

##### (ii) Producción y aislamiento de 4-nor-TKL y (Ac)4-nor-TKL usando JC2/pM0107 de *S. erythraea*

Se preparó JC2/pM0107 de *S. erythraea* por técnicas estándares (c.f. el ejemplo 26 (i)) y se inoculó en medio sacarosa-succinato que contenía 50  $\mu g/ml$  de tioestreptona y se permitió crecer durante tres-cinco días a 28-30°C.

Después de este tiempo, el caldo se filtró para eliminar los micelios y el pH se ajustó a pH 3. El caldo se extrajo tres veces con el cuarto de volúmenes de acetato de etilo y los extractos de acetato de etilo combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y el acetato de etilo se eliminó bajo presión reducida, para dar aproximadamente 10 mg/L del producto a granel. Este se digirió con 2 ml de metanol y se mezcló con 0,5 g del gel de sílice seco y luego se sometió a cromatografía súbita en una columna del mismo material (1 cm x 15 cm). La columna se eluyó con éter de dietilo, y se recuperaron fracciones de 10 ml cada una. Las fracciones 4-8 se reunieron, y el éter de dietilo se evaporó para dejar aproximadamente 15 mg del residuo aceitoso que contiene los compuestos de interés. Éstos fueron purificados después por hplc en una columna de fase inversa de octadecil-sílice (10 mm x 25 cm) eluída a un caudal de 2 ml/minuto primero con una mezcla isocrática de agua/metanol 75:25 (vol/vol) durante cinco minutos, luego con un gradiente lineal de metanol creciente, alcanzando agua/metanol 55/45 (vol/vol) después de 30 minutos. Después de aproximadamente 11 minutos, las fracciones se reunieron conteniendo, como componente minoritario, (Ac)4-nor-TKL y después de aproximadamente 18 minutos las fracciones se reunieron conteniendo, como componente principal, 4-nor-TKL.

Los espectros  $^1H$  y  $^{13}C$  de 4-nor-TKL y (Ac) 4-nor-TKL purificado eran idénticos con los espectros obtenidos para el material auténtico.

### Ejemplo 50

#### *Construcción del plásmido pCJR26*

El plásmido pCJR26 es un plásmido basado en SCP2\* que contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de ery, el primer y segundo módulo de extensión de la PKS de ery y la tioesterasa terminadora de cadena de ery, salvo que el segmento de ADN que codifica la metilmalonil-CoA:ACP aciltransferasa dentro del primer módulo de extensión ha sido específicamente sustituido por el ADN que codifica la malonil-CoA:ACP aciltransferasa del módulo 2 de la PKS de rap. Se construyó como sigue (Figura 25):

El plásmido pMO6 se digirió con NdeI y XbaI y el inserto se hibridó con el plásmido pCJR24, que había sido digerido con NdeI y XbaI y se purifica por electroforesis de gel. La mezcla de hibridación se transformó en TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pCJR26 se identificó por su modelo de restricción.

## Ejemplo 51

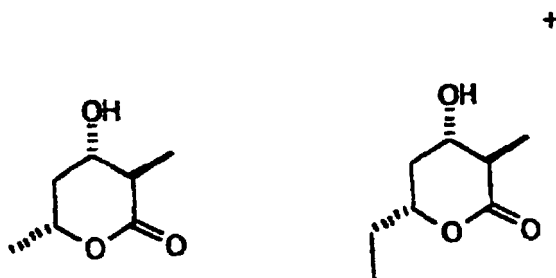
*Construcción de JC2/pCJR26 de S. erythraea y producción de derivados de TKL*

5 El plásmido pCJR26 se usó para transformar protoplastos de JC2 de *S. erythraea*. Se seleccionaron las colonias resistentes a la tioestreptona en medio R2T20 que contiene 10  $\mu\text{g/ml}$  de tioestreptona. Se probaron varios clones para detectar la presencia de pCJR26 integrado en el cromosoma, por hibridación por transferencia Southern de su ADN genómico con el gen DEBS1-TE marcado con DIG. Un clon con una copia integrada de pCJR26 se cultivó en medio SSM, conteniendo 5  $\mu\text{g/ml}$  de tioestreptona y se dejó crecer durante siete días a 28-30°C. Después de este tiempo, el  
 10 caldo se filtró para eliminar los micelios y el pH se ajustó a pH=3. El caldo se extrajo dos veces con dos volúmenes de acetato de etilo y los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con un volumen igual de cloruro de sodio saturado, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y el acetato de etilo se eliminó bajo presión reducida, para dar aproximadamente 500 mg del producto a granel. Se mostró que los productos eran (Ac)4-nor-TKL y 4-nor-TKL:

15

20

25



## Ejemplo 52

*Construcción de NRRL 2338/pCJR26 de S. erythraea y su uso en la producción de macrólidos de 14 miembros*

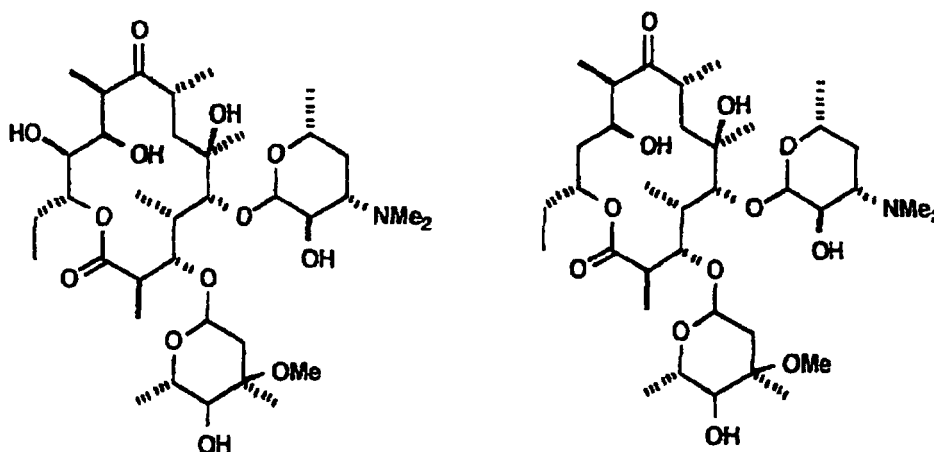
35 Se usaron aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  de ADN de pCJR49 para transformar protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea* para dar una cepa en la cual el plásmido está integrado en el cromosoma. A partir de diversas colonias, se obtuvo el ADN total y se analizó por hibridación Southern para confirmar que el plásmido se había integrado en el módulo 2 de EryAI para dar una nueva ruta biosintética de macrólido. Otras integraciones habían ocurrido para dar secuencias de plásmido repetidas. Se inoculó NRRL 2338/pCJR49 de *S. erythraea* en caldo de soja triptico que contenía 5  $\mu\text{g/ml}$  de tioestreptona y se incubó a 30°C durante tres días. 100 ml de este cultivo de semilla se usaron para inocular 2  
 40 litros de medio sacarosa-succinato definido que contenía 5  $\mu\text{g/ml}$  de tioestreptona en 5x matraces de 2 litros cada uno que contenía 500 ml de medio con 2 muelles para ayudar a la dispersión y se agitó a 300 revoluciones por minuto. Después de unos 5 días más de crecimiento, los cultivos se centrifugaron y el pH del sobrenadante se ajustó a pH 9. El sobrenadante se extrajo entonces tres veces con un volumen igual de acetato de etilo y el disolvente se eliminó por evaporación. Los productos se analizaron por HPLC/MS y se identificaron dos macrólidos como los análogos de eritromicina:

50

55

60

65



## Ejemplo 53

*Construcción del plásmido pC-ATX*

5 El plásmido pC-ATX es un plásmido basado en SCP2\* que contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de ery, el primer y segundo módulo de extensión de la PKS de ery y la tioesterasa terminadora de cadena de ery, salvo que el segmento de ADN que codifica la metilmalonil-CoA:ACP aciltransferasa dentro del primer módulo de extensión ha sido específicamente sustituido por el ADN que codifica la malonil-CoA:ACP aciltransferasa de un supuesto grupo de genes de PKS tipo I clonados a partir de ATCC 14513 de *Streptomyces cinnamonensis* (productor de poliéter poliquétido monensina). Se construyó vía varios plásmidos intermedios como sigue (Figura 26).

*Aislamiento del cósmido pSCIN02*

15 La biblioteca genómica de ATCC 14513 de *Streptomyces cinnamonensis* (el productor de monensina) fue construida a partir de los fragmentos de Sau3A de tamaño 35-45 kbp fraccionados del ADN cromosómico hibridado en el vector del cósmido pWE15 linearizado con BamHI y tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se empaquetó en partículas  $\lambda$  usando extractos de empaquetamiento Gigapack, y se transfirió en NM1blue de *E. coli*. Aproximadamente 600 colonias de la biblioteca se cultivaron en la superficie de una membrana de nilón, se dividieron, y su ADN se reticuló a la membrana por irradiación UV. La membrana se usó posteriormente para el procedimiento de proyección. El inserto de pMO8 que comprende el dominio de cetosintasa del módulo 2 de DEBS se marcó por la preparación aleatoria en presencia de 33PaATP y se usó como una sonda para la hibridación del ADN. La sonda se hibridó durante 16 h a 68°C en tampón 4,0xSSC y posteriormente se lavó durante 1 h a 68°C en tampón de 0,8xSSC. Tres clones positivos se aislaron. El ADN de los insertos de los tres clones se secuenció por el final a partir de los sitios de cebado presentes de T3 y T7 en el vector pWIS15. Una región homóloga a los dominios de la cetosintasa tipo I y malonil-CoA:ACP aciltransferasa se descubrió en la secuencia de ADN del sitio de cebado T7 usando el clon 2 (denominado pSCIN02) como plantilla. La secuenciación de ADN parcial del dominio de malonil-CoA:ACP aciltransferasa (denominado ATX) reveló que un motivo de secuencia ajeno en la supuesta parte de reconocimiento del sustrato del dominio que era sustancialmente diferente de CoA:ACP aciltransferasas específica de malonato o de metilmalonato antes descrita (Haydock, S.F. *et al.*, *FEBS* (1995) **374**:246-248)

*Construcción del plásmido pM038*

30 El segmento de ADN de aproximadamente 0,9 kbp del dominio ATX se amplificó por PCR empleando como cebadores los oligonucleótidos siguientes: 5'-CTGGCCAGGGCGCGCAATGGCCGAGCAT-3' y 5'-CCCTAG GAGTCGCCGGCAGTCCAGCGCGGCC-3' usando el ADN del cósmido pSCIN02 como plantilla. El producto PCR se reparó por el final y se hibridó con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y que luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar TGI recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pM033 (3,5 kbp) se identificó por su modelo de restricción.

*Construcción del plásmido pM034*

40 El plásmido pM034 es un derivado de pM06 con un sitio de policlonación insertado después del codón de terminación del gen D1-AT2 insertado. El plásmido pM06 se digirió con EcoRI e HindIII y se hibridó con dos oligonucleótidos que forman la región bicatenaria del sitio de policlonación:

45 5'-AATTCATAACTAGTAGGAGGTCTGGCCATCTAGA-3' y 5'-TCGAAGATCTACCGGTCTGGAGGATGAT CAATAC-3'.

50 La mezcla se hibridó y se transformó en TGI de *E. coli*. Las colonias individuales se comprobaron según su contenido de plásmido. El plásmido deseado pM034 (13,5 kbp) se identificó por su modelo de restricción.

*Construcción del plásmido pM035*

55 El plásmido pro35 es un derivado de pM034 que contiene el gen de TKLS-AT2 y un gen de crotonil-CoA-reductasa acoplado por translación de *Streptomyces collinus* (Wallace *et al.*, *E. J. Biochem.* (1995) **233**: 954-962). El gen de crotonil-CoA-reductasa se escindió del plásmido pZYB3 (obsequio del catedrático K. Reynolds) como un fragmento de NdeI-BamHI, que se trata con nucleasa de alubia mung para producir extremos romos y se hibridó en pM034 antes cortado con SpeI y igualmente terminado en romo usando la nucleasa de alubia mung. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pM035 (14,2 kbp), con la orientación correcta del gen de crotonil-CoA-cetoreductasa, se identificó por su modelo de restricción.

*Construcción del plásmido pM036*

65 El plásmido pM033 se digirió con Ball y AvrII y el inserto se hibridó con el plásmido pro35 que había sido digerido con Ball y AvrII. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y las colonias individuales se comprobaron según su contenido de plásmido. El plásmido deseado pM036 (13,5 kbp) se identificó por su modelo de restricción.

Ejemplo 54

*Construcción del plásmido pC-ATX*

5 El plásmido pM036 se digirió con NdeI y XbaI y el inserto se hibridó con el plásmido pCJR29, que había sido digerido con NdeI y XbaI y se purificó por electroforesis de gel. La mezcla de hibridación se transformó en TG1 recO de *E. coli* y las colonias individuales se comprobaron según su contenido de plásmido. El plásmido deseado pC-ATX se identificó por su modelo de restricción.

10

Ejemplo 55

*Construcción de JC2/pC-ATX de S. erythraea y producción de derivados de TKL*

15 El plásmido pC-ATX se usó para transformar protoplastos de JC2 de *S. erythraea*. Se seleccionaron las colonias resistentes a la tioestreptona en medio R2T20 que contenía 10 µg/ml de tioestreptona. Se probaron varios clones para detectar la presencia de pC-ATX integrado en el cromosoma, mediante hibridación por transferencia Southern de su ADN genómico con ADN marcado con DIG que codifica el gen de DEBS1-TE.

20 Un clon con una copia integrada de pC-ATX se cultivó en medio SSM, que contenía 5 µg/ml de tioestreptona, y se dejó crecer durante siete días a 28-30°C. Después de este tiempo, el caldo se filtró para eliminar los micelios y el pH se ajustó a pH=3. El caldo se extrajo dos veces con dos volúmenes de acetato de etilo y los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con un volumen igual de cloruro de sodio saturado, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y el acetato de etilo se eliminó bajo presión reducida, para dar aproximadamente 500 mg del producto a granel. Los  
25 productos se caracterizaron por cromatografía de gases, espectrometría de masas y RMN, y se mostró que eran δ-lactona del ácido (2S, 3R, 4S, SR)-2-metil-4-etil-3,5-dihidroxi-n-hexanoico y δ-lactona del ácido (2S, 3R, 4S, 5R)-2-metil-4-etil-3,5-dihidroxi-n-heptanoico:

30

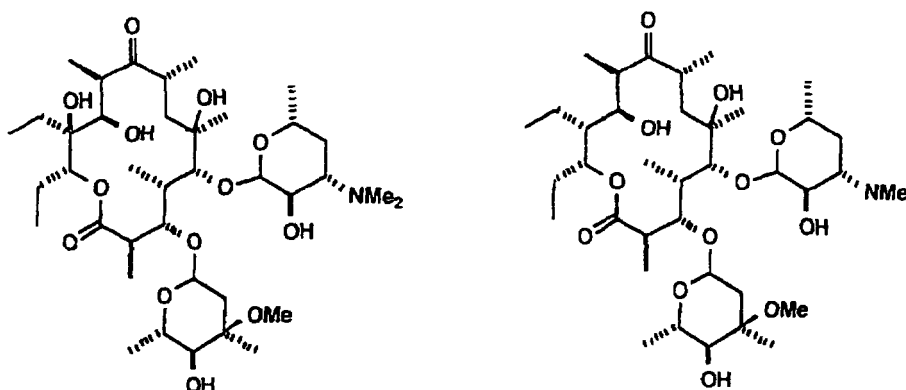


Ejemplo 56

40 *Construcción de NRRL 2338/pcatx de S. erythraea y su uso en la producción de macrólidos de 14 miembros*

Se usaron aproximadamente 5 µg de ADN de pC-ATX para transformar protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea* para dar una cepa en la cual el plásmido está integrado en el cromosoma. A partir de diversas colonias, se obtuvo el ADN total y se analizó por hibridación Southern para confirmar que el plásmido se había integrado en el módulo 2 de EryAI para dar una nueva ruta biosintética de macrólidos. Otras integraciones habían ocurrido para dar secuencias de plásmido repetidas. Se inoculó NRRL2338/pC-ATX de *S. erythraea* en caldo de soja tréptico que contenía 5 µg/ml de tioestreptona y se incubó a 30°C durante tres días. Se usaron 100 ml de este cultivo de semilla para inocular 2 litros de medio definido de sacarosa-succinato definido que contiene 5 µg/ml de tioestreptona en 5x matraces de 2 litros cada uno que contiene medio de 500 ml con 2 muelles para ayudar a la dispersión y se agitó a 300 revoluciones por minuto.  
50 Después de unos 5 días más de crecimiento, los cultivos se centrifugaron y el pH del sobrenadante se ajustó a pH 9. El sobrenadante se extrajo entonces tres veces con un volumen igual de acetato de etilo y el disolvente se eliminó mediante evaporación. Los productos se analizaron por HPLC/MS y se identificaron dos productos macrólidos:

55



## Ejemplo 57a

*Construcción del plásmido pC-AT12*

5 El plásmido pC-AT12 es un plásmido basado en SCP2\* que contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de ery, el primer y segundo módulo de extensión de la PKS de ery y la tioesterasa terminadora de cadena de ery, salvo que el segmento de ADN que codifica la metilmalonil-CoA:ACP aciltransferasa dentro del segundo módulo de extensión ha sido específicamente sustituido por el ADN que codifica la malonil-CoA:ACP aciltransferasa del módulo 2 de la PKS de rap. Se construyó vía varios plásmidos intermedios como sigue (Figura 27).

10

*Construcción del plásmido pM025*

15 El segmento de ADN de aproximadamente 1,0 kbp del gen de eryAI de *S. erythraea* que se extiende desde el nucleótido 6696 al nucleótido 7707 de eryAI (Donadio. *S. et al.*, *Science* (1991) **252**, 675-679) se amplificó por PCR empleando como cebadores oligonucleótidos sintéticos: 5'-GGCGGGTCCGGAGGTGTTACCGAGTT-3' y 5'-ACCTTGCCAGGGAAGACGAACACTGA-3', y el plásmido pNTEp2 como plantilla. El producto PCR se reparó por el final y se hibridó con el plásmido pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pM025 (3,6 kbp), en el que el sitio StuI que linda con el inserto es adyacente al sitio HindIII en el polienlazante, se identificó por su modelo de restricción.

20

*Construcción del plásmido pM026*

25 El segmento de ADN de aproximadamente 0,6 kbp del gen de eryAI de *S. erythraea* que se extiende desde el nucleótido 8660 al nucleótido 9258 de eryAI, se amplificó por PCR empleando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: 5'-TCCTAGGCCGGGCCGACTGGTCGACCTGCCGGGTT-3' y 5'-AAACACCGCGACCTGGTCCTCC GAGC-3', y el plásmido pNTEP2 como plantilla. El producto PCR se reparó por el final y se hibridó con el plásmido pUC1B, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pM026 (3,2 kbp), en el que el sitio AvrII es adyacente al sitio HindIII del polienlazante, se identificó por su modelo de restricción.

30

*Construcción del plásmido pM027*

35 El plásmido pM025 se digirió con EcoRI y Ball y el inserto de 1,0 kbp se hibridó con el plásmido pM02 que había sido digerido con EcoRI y Ball. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pM027 (4,4 kbp) se identificó por su modelo de restricción.

40

*Construcción del plásmido pM032*

45 El plásmido pM026 se digirió con AvrII e HindIII y el inserto de 0,6 kbp se hibridó con el plásmido pMC27 que había sido digerido con AvrII e HindIII. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobaron las colonias individuales según su contenido de plásmido. El plásmido deseado pM032 (5,1 kbp) se identificó por su modelo de restricción.

*Construcción del plásmido pM033*

50 El plásmido pM032 se digirió con BspEI y SexAI y el inserto de 2,7 kbp se hibridó con el plásmido pNTEP2 que había sido digerido con las mismas dos enzimas y se purificó por electroforesis de gel para eliminar el inserto de 2,8 kbp. La mezcla de hibridación se transformó en TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido pM033 (12,8 kbp) se identificó por su modelo de restricción.

55

## Ejemplo 57b

*Construcción del plásmido pC-AT12*

60 El plásmido pM033 se digirió con NdeI y XbaI y el inserto se hibridó con el plásmido pCJR29, que había sido digerido con NdeI y XbaI y se purificó por electroforesis de gel. La mezcla de hibridación se transformó en TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pC-AT12 se identificó por su modelo de restricción.

65

## Ejemplo 58a

*Construcción de JC2/pC-AT12 de S. erythraea y producción de derivados de TKL*

5 El plásmido pC-AT12 se usó para transformar protoplastos de JC2 de *S. erythraea*. Se seleccionaron las colonias resistentes a tioestreptona en medio R2T20 que contiene 10  $\mu\text{g/ml}$  de tioestreptona. Se probaron varios clones para detectar la presencia de pC-AT12 integrado en el cromosoma, mediante hibridación por transferencia Southern de su ADN genómico con ADN marcado con DIG que codifica el gen de DEBS1-TE.

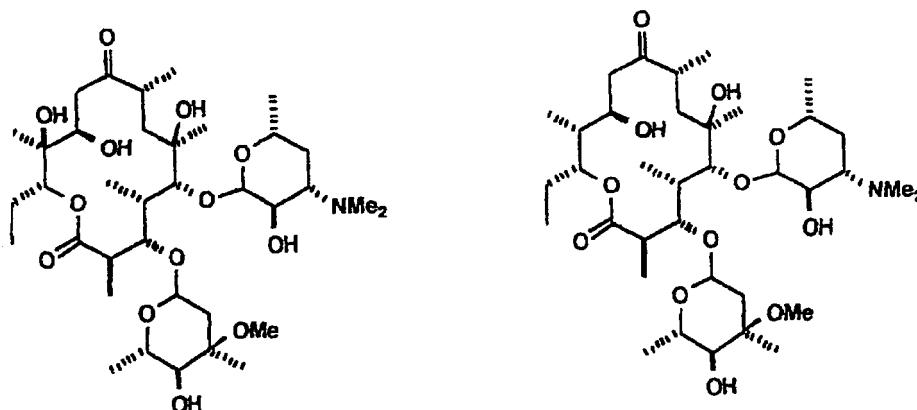
10 Un clon con una copia integrada de pC-AT12 se cultivó en medio SSM, que contenía 5  $\mu\text{g/ml}$  de tioestreptona y se dejó crecer durante siete días a 28-30°C. Después de este tiempo, el caldo se filtró para eliminar los micelios y el pH se ajustó a pH=3. El caldo se extrajo dos veces con dos volúmenes de acetato de etilo y los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con un volumen igual de cloruro de sodio saturado, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y el acetato de etilo se eliminó bajo presión reducida, para dar aproximadamente 500 mg del producto a granel. Se  
15 mostró que los productos eran  $\delta$ -lactona del ácido (3R, 4S, 5R)-4-metil-3,5-dihidroxi-n-hexanoico y  $\delta$ -lactona del ácido (3R, 4S, SR)-4-metil-3,5-dihidroxi-n-heptanoico:



## Ejemplo 58b

*Construcción de NRRL 2338/pcat12 de S. erythraea y su uso en la producción de macrólidos de 14 miembros*

35 Se usaron aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  de ADN de pC-AT12 para transformar protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea* para dar una cepa en la cual el plásmido está integrado en el cromosoma. A partir de diversas colonias, se obtuvo el ADN total y se analizó por hibridación Southern para confirmar que el plásmido ha integrado 3' del módulo 2 de EryAI para dar una nueva ruta biosintética de macrólidos. Otras integraciones habían ocurrido para dar secuencias de plásmido repetidas. Se inoculó NRRL2338/pC-AT12 de *S. erythraea* en caldo de soja tréptico que contenía 5  $\mu\text{g/ml}$  de tioestreptona y se incubó a 30°C durante tres días. Se usaron 100 ml de este cultivo de semilla para inocular 2 litros de medio sacarosa-succinato definido que contenía 5  $\mu\text{g/ml}$  ml de tioestreptona en 5x matraces de 2 litros cada uno que contenían 500 ml de medio con 2 muelles para ayudar a la dispersión y se agitó a 300 revoluciones por minuto. Después de unos 5 días más del crecimiento, los cultivos se centrifugaron y el pH del sobrenadante se ajustó a pH  
45 9. El sobrenadante se extrajo entonces tres veces con un volumen igual de acetato de etilo y el disolvente se eliminó mediante evaporación. Los productos se analizaron por HPLC/MS y se identificaron dos productos de macrólido:



## Ejemplo 59

*Construcción del plásmido pCJR49*

5 El pCJR49 es un plásmido basado en pCJR24 que contenía un gen de DEBS1-TE mutante que no tiene ninguna cetoreductasa en el módulo 2, y el dominio AT en el módulo 2 ha sido sustituido por RAPS AT2 a fin de incorporar un extendedor de malonilo en vez de un extendedor de metilmalonilo en el segundo módulo (Figura 28).

10 El pMO32 se digirió con BspE I y SexA I y el fragmento que contenía el AT del módulo 2 de RAP se clonó en pUC1-O que había sido previamente digerido con BspE I y SexA I, para producir el plásmido pCJR43.

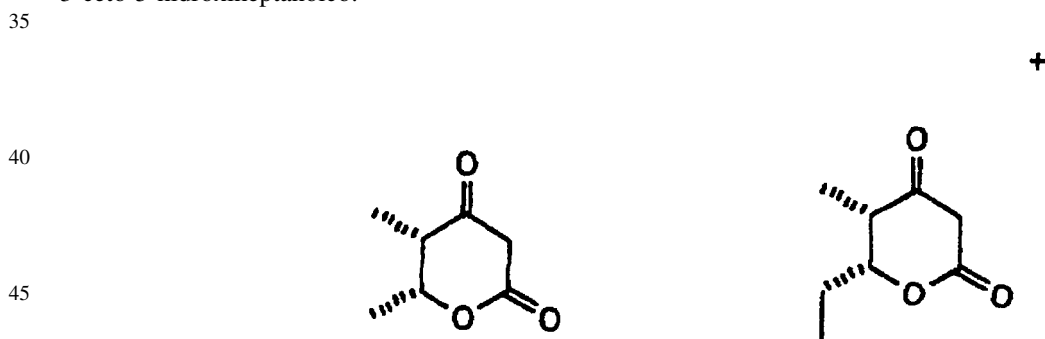
15 El pCJR43 se digirió con Nde I y Xba I y el fragmento que contiene al mutante el gen de DEBS1-TE se clonó en pCJR24 que había sido previamente digerido con Nde I y Xba I, para producir el plásmido pCJR49. El pCJR49 se confirmó por la correlación de la enzima de restricción.

## Ejemplo 60

*Construcción de JC2/pCJR49 de S. erythraea y producción de derivados de TKL*

20 i) Se usaron aproximadamente 5  $\mu$ g de ADN de pCJR49 para transformar protoplastos de JC2 de *S. erythraea* para dar una cepa en la cual el plásmido está integrado en el cromosoma. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern para confirmar que el plásmido se ha integrado en el eryTE. El JC2/pCJR49 de *S. erythraea* se inocula en caldo de soja tríptico que contiene 5  $\mu$ g/ml de tioestreptona y se incuba a 30°C durante tres días. Se usaron 100 ml de este cultivo de semilla para inocular 2 litros de medio sacarosa-succinato definido que contiene 5  $\mu$ g/ml de tioestreptona en 5x matraces de 2 litros conteniendo cada uno 500 ml de medio con 2 muelles para ayudar a la dispersión y se agitó a 300 revoluciones por minuto. Después de unos 5 días más de crecimiento, los cultivos se centrifugaron y el pH del sobrenadante se ajustó a pH 3. El sobrenadante se extrajo entonces tres veces con un volumen igual de acetato de etilo y el disolvente se eliminó mediante evaporación. Los productos se disolvieron en metanol y se analizaron por GC-MS en un Sistema GCQ Finnegan-MAT.

30 Este análisis indicó que por comparación a estándares sintéticos, estaban presentes dos nuevas lactonas. Estos productos eran  $\delta$ -lactona del ácido (4S, 5R)-4-metil-3-ceto-5-hidroxihexanoico y  $\delta$ -lactona del ácido (4S, 5R)-4-metil-3-ceto-5-hidroxiheptanoico:

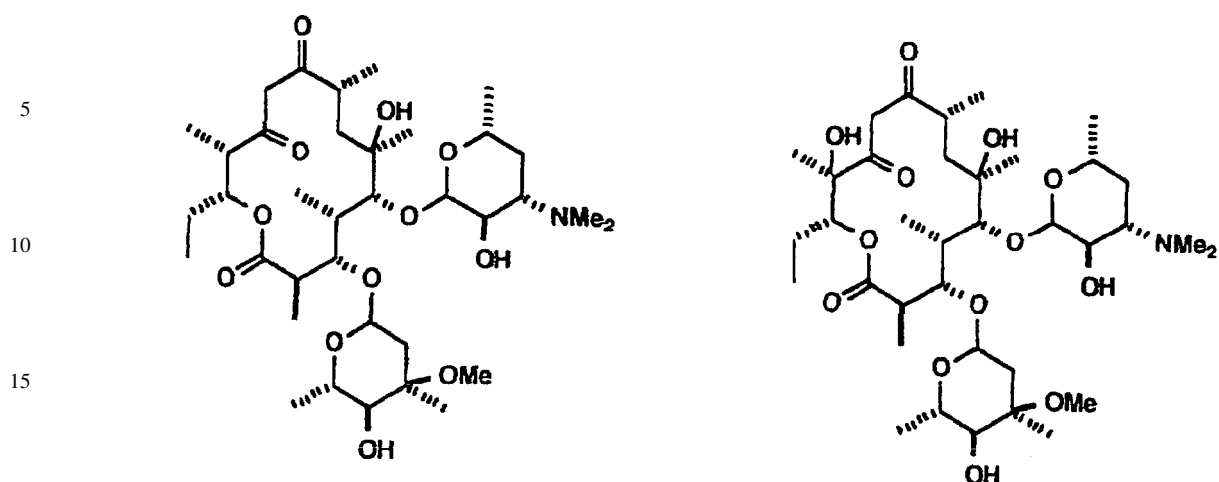


## Ejemplo 61

*Construcción de NRRL 2338/pCJR49 de S. erythraea y su uso para la producción de macrólidos de 14 miembros*

55 Se usaron 5  $\mu$ g de ADN de pCJR49 para transformar protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea* para dar una cepa en la cual el plásmido está integrado en el cromosoma. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern para confirmar que el plásmido ha integrado en el módulo 2 de EryAI para dar una nueva ruta biosintética de macrólidos. Otras integraciones habían ocurrido para dar secuencias de plásmido repetidas. El /pCJR49 de *S. erythraea* se inocula en caldo de soja tríptico que contiene 5  $\mu$ g/ml de tioestreptona y se incuba a 30°C durante tres días. Se usaron 100 ml de este cultivo de semilla para inocular 2 litros de medio sacarosa-succinato definido que contiene 5  $\mu$ g/ml de tioestreptona en 5x matraces de 2 litros que contiene cada uno 500 ml de medio con 2 muelles para ayudar a la dispersión y se agita a 300 revoluciones por minuto. Después de unos 5 días más de crecimiento, los cultivos se centrifugaron y el pH del sobrenadante se ajustó a pH 9. El sobrenadante se extrajo entonces tres veces con un volumen igual de acetato de etilo y el disolvente se eliminó mediante evaporación. Los productos se analizaron por HPLC/MS y se identificaron dos macrólidos:

65



## Ejemplo 62

*Construcción del plásmido (Figura 29A-F)*

25 El plásmido pCART11 es un plásmido basado en pRM52 que contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de avermectina, módulos 5 y 6 de la PKS de ery, y la tioesterasa terminadora de cadena de ery. Se construyó vía varios plásmidos intermedios como sigue.

*Construcción del plásmido pCAR1*

30 El plásmido pARLD se digirió con BamHI y BglII y el inserto de 1,70 kbp se hibridó con el plásmido pEXD3 que había sido digerido con BglII. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pCAR1 se identificó por su modelo de restricción.

*Construcción del plásmido pCAR5*

35 El segmento de ADN de 250 bp del gen de eryAIII de *S. erythraea* que se extiende desde el nucleótido 4807 al nucleótido 5052 de eryAIII, se amplificó por PCR empleando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: 5'-TTTGCTAGCGATCGTCCGGCATGGCGTGCCGGTT3' y 5'-CCCACGAGATCTCCAGCATGATCC-3'.

40 El plásmido pEXD3 se usó como plantilla. El producto PCR se reparó por el final y se hibridó con pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pCAR5 en el que el sitio NheI está adyacente al sitio EcoRI del polienlazante, se identificó por su modelo de restricción y análisis de secuencia.

*Construcción del plásmido pCAR2*

45 El plásmido pCAR5 se digirió con NheI y BglII y el inserto de 250 bp se hibridó con el plásmido pCAR1 que había sido digerido con NheI y BglII. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pCAR2 se identificó por su modelo de restricción.

*Construcción del plásmido pCAR21*

50 El plásmido pARTr se digirió con XbaI y el gen de tetraciclina de 1,20 kbp se hibridó con el plásmido pCAR2 que había sido digerido con XbaI. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pCAR21 se identificó por su modelo de restricción.

*Construcción del plásmido pCART3*

55 El plásmido pCAR21 se digirió con PacI y PstI y el inserto de 13,0 kbp se hibridó con el plásmido pRM52 que había sido digerido con PacI y NsiI. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pCART3 se identificó por su modelo de restricción.

*Construcción del plásmido pIGlet*

El plásmido pARTr se digirió con XbaI y el gen de tetraciclina de 1,20 kbp se hibridó con el plásmido pIGI que había sido digerido con XbaI. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido pIGlet deseado se identificó por su modelo de restricción.

*Construcción del plásmido pCART11*

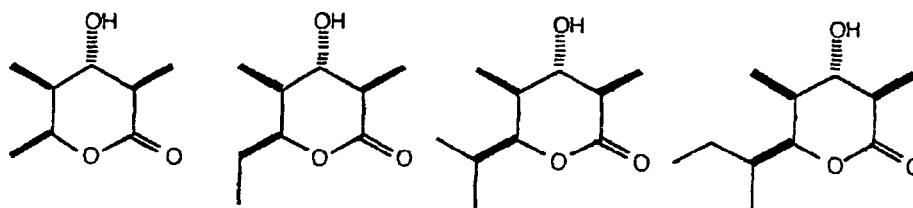
El plásmido pCAR21 se digirió con NheI y el inserto de 12,0 kbp se hibridó con el plásmido pIGlet que había sido digerido con NheI. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobaron las colonias individuales resistentes a la actividad de tetraciclina según su contenido de plásmido. El plásmido deseado pCART11 se identificó por su modelo de restricción.

## Ejemplo 63

*Construcción de NRRL2338/pCART11 de S. erythraea y su uso para la producción de triquetida lactonas*

Aproximadamente 5-10  $\mu\text{g}$  de pCART11, aislado de TG1 recO, se transformaron en NRRL2338 de *S. erythraea* y se aislaron las colonias estables resistentes a la tioestreptona.

Se realizó una fermentación de 5 ml de NRRL2338/pCART11 de *S. erythraea* en medio TSB y después de dos días a 30°C, se usó el micelio para inocular 50 ml de medio sacarosa-succinato que contiene tioestreptona (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Después del crecimiento a 30°C durante cuatro días, todo el caldo se extrajo dos veces con un volumen igual de acetato de etilo. El disolvente se concentró y la mezcla se analizó en GC-MS. Se identificaron los compuestos siguientes.



## Ejemplo 64

*Construcción del plásmido pARE24*

El plásmido pARE24 es un plásmido basado de pCJR24 que contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de ery, los módulos 5 y 6 de la PKS de ery, y la tioesterasa terminadora de cadena de ery. Se construyó como sigue (Figura 30).

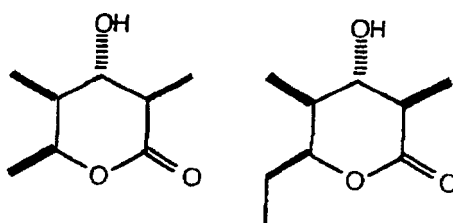
*Construcción del plásmido pARE24*

El plásmido pCAR21 se digirió con PacI y XbaI y el inserto de 13,0 kbp se hibridó con el plásmido pCJR24 que había sido digerido con PacI y XbaI. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pARE24 se identificó por su modelo de restricción.

*Construcción de NRRL2338/pARE24 de S. erythraea y su uso para la producción de triquetida lactonas*

Aproximadamente 5-10  $\mu\text{g}$  de pARE24, aislado de TG1 recO se transformaron en NRRL2338 de *S. erythraea* y se aislaron las colonias estables resistentes a la tioestreptona.

Se realizó una fermentación de 5 ml de NRRL2338/pARIS24 de *S. erythraea* en medio TSB y después de dos días a 30°C, se usó el micelio para inocular 50 ml de medio sacarosa-succinato que contiene tioestreptona (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Después del crecimiento a 30°C durante cuatro días, todo el caldo se extrajo dos veces con un volumen igual de acetato de etilo. El disolvente se concentró y la mezcla se analizó en GC-MS. Se identificaron los compuestos siguientes.



## ES 2 337 424 T3

### Ejemplo 65

#### Construcción del plásmido (Figura 30) pARA24

- 5 El plásmido pARA24 es un plásmido basado en pCJR24 que contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de avermectina, los módulos 5 y 6 de la PKS de ery, y la tioesterasa terminadora de cadena de ery. Se construyó como sigue.

#### Construcción del plásmido pARA24

- 10 El plásmido pIG1 se digirió con PacI y NheI y el inserto de 1,70 kbp se hibridó con el plásmido pARIS24 que había sido digerido con PacI y NheI. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pARA24 se identificó por su modelo de restricción.

15

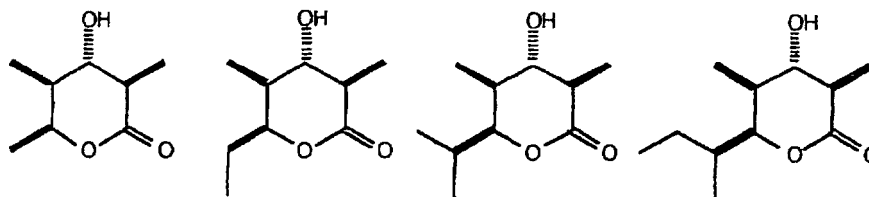
### Ejemplo 66

#### Construcción de NRRL2338/pARA24 de *S. erythraea*

- 20 Aproximadamente 5-10  $\mu$ g de pARA24, aislado de TG1 recO, se transformaron en NRRL2338 de *S. erythraea* y se aislaron las colonias estables resistentes a la tioestreptona.

- 25 Se realizó una fermentación de 5 ml de NRRL2338/pARA24 de *S. erythraea* en medio TSB y después de dos días a 30°C, el micelio se usó para inocular 50 ml de medio sacarosa-succinato que contiene tioestreptona (50  $\mu$ g/ml). Después del crecimiento a 30°C durante cuatro días, todo el caldo se extrajo dos veces con un volumen igual de acetato de etilo. El disolvente se concentró y la mezcla se analizó en GC-MS. Se identificaron los compuestos siguientes.

30



### Ejemplo 67

#### Construcción del plásmido pARL3

- 45 El plásmido pARL3 es un plásmido basado en pCJR24 que contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de ery, los módulos 5 y 6 de la PKS de ery, y la tioesterasa de ery. La unión entre el módulo de carga y el dominio de KS5 se hace en el mismo borde del extremo N-terminal de KS5. Se construyó vía varios plásmidos intermedios como sigue (Figura 31):

#### Construcción del plásmido pARL1

- 50 El segmento de ADN de 450 bp del gen de eryAI de *S. erythraea* que se extiende desde el nucleótido 1 al nucleótido 10631 de eryAI, se amplificó por PCR empleando como cebadores los oligonucleótidos sintéticos: (las bases en negrita denotan los sitios de la enzima de restricción).

55

#### SphI

5' **GGCGGCATGCGGCGGTTCC**T3'

60

#### NheI

#### HpaI

65

5' **AAGCTAGCGGTT**CGCCGGGCGCCGCTTCGTTGGTCCGCGCGGGGTTAAC3'

## ES 2 337 424 T3

El plásmido pARE24 se usó como plantilla. El producto PCR se reparó por el final y se hibridó con pUC18, que había sido linearizado mediante digestión con SmaI y que luego se había tratado con fosfatasa alcalina. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pARL1, en el que el sitio NheI es adyacente al sitio EcoRI del polienlazante, se identificó por su modelo de restricción y análisis de secuencia.

### Construcción del plásmido pARL2

El plásmido pARL1 se digirió con NheI y SphI y el inserto de 450 bp se hibridó con el plásmido pARE24 que había sido digerido con NheI y SphI. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pARL2 se identificó por su modelo de restricción.

### Construcción del plásmido pARL3

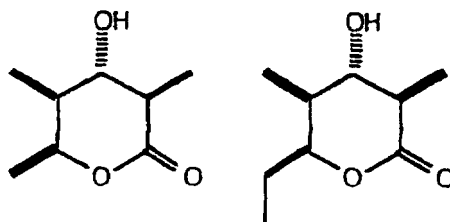
Se sintetizaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos complementarios para cuando se hibridaran, tendrían el modelo necesario en los extremos 5' y 3' que es producido por la acción de HpaI y NheI respectivamente 5'-AACCCGCGCGCGGACCAACGAAGCGGCGCCCGGCGAACCG-3' y 5'-CTAGCGGTTCCGCCGGGCGCCGCTTCGTTGGTCCGCGCGGGGTT-3'

Los oligonucleótidos sintéticos se hibridaron para dar el ADN bicatenario que se hibridó con el plásmido pARL2 que había sido digerido con NheI y HpaI. La mezcla de hibridación se usó para transformar TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pARL3 se identificó por su modelo de restricción.

### Ejemplo 68

#### Construcción de JC2-pARL3 de *S. erythraea* y su uso para la producción de triquetida lactonas

Aproximadamente 5-10  $\mu\text{g}$  de pARL3, aislado de TG1 recO, se transformaron en JC2 de *S. erythraea* y se aislaron las colonias estables resistentes a la tioestreptona. Se realizó una fermentación de 5 ml de JC2-pARL3 en medio TSB y después de dos días a 30°C, el micelio se usó para inocular 50 ml de medio sacarosa-succinato que contiene tioestreptona (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Después del crecimiento a 30°C durante cuatro días, todo el caldo se extrajo dos veces con un volumen igual de acetato de etilo. El disolvente se concentró y la mezcla se analizó en GC-MS. Se identificaron los compuestos siguientes:



### Ejemplo 69

La construcción de ERMD1 de *S. erythraea*, que lleva un gen de PKS híbrida en el cual el didominio de carga de avr se sustituye por el didominio de carga de ery de NRRL 2338 de *S. erythraea*.

#### (i) Construcción del plásmido pAVLD

El plásmido pCRabc (Ejemplo 9) se linearizó con BamHI y se hibridó a pIJ702 previamente digerido con BglII. La mezcla contenía el plásmido deseado pAVLD (Figura 32). La mezcla de hibridación se transformó en TG1 recO de *E. coli* y se comprobó el contenido de plásmido de las colonias individuales. El plásmido deseado pAVLD se identificó por su modelo de restricción (Figura 32).

#### (ii) Construcción de ERM D1 de *S. erythraea*

Aproximadamente 5-10  $\mu\text{g}$  de pAVLD, aislado de TG1recO de *E. coli* (pAVLD), se transformaron en NRRL2338 de *S. erythraea* y se aislaron las colonias estables resistentes a la tioestreptona. Una de estas colonias se seleccionó y el ADN total se digirió con PstI y se analizó por hibridación Southern empleando como sonda el inserto del plásmido pCRc que contiene el fragmento del gen de ery AI que codifica el dominio de cetosintasa KS1. El análisis mostró fragmentos de PstI positivamente hibridizante de 8,5 kbp, 4,8 kbp y 33 kbp, indicando que la presencia de dos copias recíprocamente integradas de pAVLD (Figura 33).

## ES 2 337 424 T3

### Ejemplo 70

#### *Aislamiento de eritromicinas modificadas en C-13*

5 Se realizó una fermentación de 50 ml de ERMD1 de *S. erythraea* en medio de agua del grifo y después de 4 días a 30°C el micelio se cosechó y se usó para inocular 1,5 litros de medio sacarosa-succinato que contiene tioestreptona (50 g/ml).

10 Después del crecimiento a 30°C durante 4 días, todo el caldo se extrajo dos veces con un volumen igual de acetato de etilo.

15 Los extractos combinados se concentraron bajo presión reducida y se sometieron dos veces a cromatografía de capa delgada preparatoria en placas de sílice (20 x 20 cm) eluidas con cloroformo/metanol/0,88 amoníaco 8:2:0,01 (por vol). Los productos se separaron por hplc en una columna de fase inversa desactivada de C18 PhaseSep S5odS (octadecil-sílice) 6 (4,6 mm x 250 mm), se eluyeron con metanol/acetato de amonio al 0,5% (70:30 (vol/vol), a 1 ml/min. Las fracciones se reunieron entre 7 y 11 minutos a partir de tres inyecciones separadas, y las fracciones reunidas se inyectaron de nuevo en diez inyecciones separadas. El orden de elución de la columna fue: análogos de eritromicina B, seguido de análogos de eritromicina D y análogos de eritromicina A. Los análogos B y D aparecieron después de 8-10 minutos, el análogo de eritromicina A 3-4 minutos más tarde. Los análogos que contienen una unidad iniciadora C-4 (isobutirilo) se eluyen antes, con los análogos con la unidad iniciadora C-5 (2-metilbutirilo) que aparece varios minutos más tarde, aunque se superpongan el C-4 tardío (análogo de eryA) y C-5 temprano (análogos de eritromicinas B y D). La MS de alta resolución dio resultados para los análogos de C-4 eryA, eryB y eryD, y para los análogos C-5 de eryA y eryB, que corresponden estrechamente a aquellos calculados:

25	Análogo	Masa calc.	Masa medida
	C5-eryA	762,5004	762,5021
30	C4-eryA	748,4847	748,4820
	C5-eryB	746,4898	748,5077
	C4-eryB	732,4898	732,4933

35

40 En estos experimentos las eritromicinas naturales estaban presentes sólo en cantidades bajas o no detectables, y no había ninguna cantidad detectable de análogos de eryC. La proporción de concentración total de compuestos C-4/C-5 en el caldo de fermentación, como se evalúa por ESMS de extractos de acetato de etilo de caldos, estaba entre 4:1 y 6:1 a favor de los compuestos C-4. La proporción de análogos A:B:D es variable, aproximadamente 15:60:25, pero con una proporción creciente de análogos A según procede la fermentación. El rendimiento total de eritromicinas es aproximadamente 400 µg/litro.

### 45 Ejemplo 71

#### *Construcción y uso de NRRL2338/pRMTE de S. erythraea*

##### (i) Construcción

50 Aproximadamente 5 µg del plásmido pRMTE (Ejemplo 6), aislado de TGI recO de *E. coli* (pRMTE), se transformaron en protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea* y se aislaron las colonias estables resistentes a la tioestreptona. Uno de éstos se seleccionó y se denominó NRRL2338/pRMTE de *S. erythraea*.

##### 55 (ii) Producción realizada de eritromicina A y eritronolidas usando NRRL2338/pRMTE de *S. erythraea*

60 Se cultivó NRRL2338/pRMTE de *S. erythraea* en sacarosa y medio succinato que contiene 50 µg/ml de tioestreptona a 28-30°C. Después de 3 días, todo el caldo se extrajo dos veces con un volumen igual de acetato de etilo, los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con una disolución de cloruro de sodio saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron bajo la presión reducida.

65 El examen del extracto por cromatografía de capa fina en placas de sílice eluidas con isopropil-eter:metanol:hidróxido de amonio 75:35:1 (por volumen) mostró la presencia de varios componentes. La espectrometría de masas por electropulverización de los extractos reveló la presencia de una mezcla de eritromicina A, eritronolida B (EB) y B 6-desoxieritronolida (6-DEB), junto con cantidades menores de (Ac)-6-DEB como su aducto de sodio, (Ac)-EB como su aducto de Na (411,1), y EB como su aducto de Na (424,1), y también TKL (m/e 159,1). El rendimiento de eritromicina A más eritronolida B era aproximadamente 500 mg/L de medio, comparado con aproximadamente 50 mg/L producido por NRRL2338 de *S. erythraea* fermentado en condiciones idénticas. Las células de NRRL2338/pRMTE

## ES 2 337 424 T3

de *S. erythraea* cosechadas a partir del caldo de fermentación después de 3 días se rompieron y su contenido en proteína se examinó por electroforesis de gel de dodecil-sulfato de sodio/poliacrilamida. Se observaron tres bandas de peso molecular alto, correspondiente a las subunidades multienzimáticas de PKS de eritromicina DEBS1, DEBS2 y DEBS3, aproximadamente diez veces más intensas que la misma banda de proteína vista a partir de extractos celulares de NRRL2338 de *S. erythraea* preparado por el mismo procedimiento (Caffrey, P. *et al. FEBS Letters* (1992) **304**:225-228).

Se realizó una fermentación idéntica de NRRL2338/pRMTE de *S. erythraea* salvo que el medio se suplementó con propionato de potasio 5 mM. Después de tres días, el caldo se extrajo con acetato de etilo como antes, y los extractos de acetato de etilo combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron. La TLC preparatoria usando el sistema isopropil-éter:metanol:hidróxido de amonio 75:35:1 (por volumen) separó los dos componentes principales. La TLC analítica mostró que el componente de dirección más rápido (Rf 0,8) tiene la misma movilidad que el 6-DEB auténtico; y el material de migración más lento fue una mezcla aproximadamente igual de un componente de Rf 0,63, co-migrando con una muestra auténtica de TKL; y un componente de Rf 0,60, con la misma movilidad que una muestra auténtica de EB. La espectrometría de masas por electropulverización (ESMS) en un espectrómetro de masas VG BioQ operado en el modo de ión positivo mostró que el componente de Rf 0,75 tenía una m/e 387,4, como se requiere para 6-DEB. La ESMS de la mezcla de los componentes con los valores de Rf 0,60 y 0,63 confirmó la presencia de TKL y EB.

Ejemplo 72

### *Construcción y uso de TER43/pRMTE de S. erythraea*

(i) *Construcción*

Aproximadamente 5 µg del plásmido pRMTE se transformaron en protoplastos de TER43 de *S. erythraea* (Cortes, J. *et al., Science* (1995) **268**:1487-1489) y se aislaron las colonias estables resistentes a la tioestreptona. Uno de éstos se seleccionó y se denominó TER43/pRMTE de *S. erythraea*.

(ii) *Producción realizada de TKL usando TER43/pRMTE de S. erythraea*

Se inoculó TER43/pRMTE de *S. erythraea* en 1L de medio sacarosa-succinato y se dejó crecer durante 3 días a 28-30°C. Después de 3 días, el caldo se extrajo dos veces con un volumen igual de acetato de etilo, y los extractos de acetato de etilo combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron. El análisis del extracto por espectrometría de masas por electropulverización (operado en el modo de ión positivo) mostró la presencia de TKL (m/e 173,1) y de (Ac)-TKL (m/e 159,1). El rendimiento combinado de triquetida lactonas fue 100 mg/L, comparado con 10 mg/L obtenidos por la fermentación de TER43 de *S. erythraea* en condiciones idénticas. Las células de TER43/pRMTE de *S. erythraea*, cosechadas a partir del caldo de fermentación después de 3 días, se rompieron y su contenido en proteína se examinó por electroforesis de gel de dodecil-sulfato de sodio/poliacrilamida. Una banda de peso molecular alto, correspondiente a la subunidad de eritromicina de PKS DEBS1 con el dominio de tioesterasa adjunto (Cortes, J. *et al. Science* (1995) **268**:1487-1489) se observó, aproximadamente diez veces más intensa que la misma banda de proteína vista a partir de extractos celulares de *S. erythraea* preparados por el mismo procedimiento.

Ejemplo 73

### *Construcción y uso de NRRL2338/pCJRTE de S. erythraea (pCJR30)*

(i) *Construcción*

Aproximadamente 25 g del plásmido pCJRTE (pCJR30) se transforman en protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea* y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado específicamente en los genes *eryA* mediante recombinación homóloga, para colocar los genes *eryA* residentes bajo el control del promotor *actI* derivado del plásmido pCJRTE (pCJR30), mientras que el gen DEBS1-TE llevado por el plásmido entrante se coloca mediante el acontecimiento de integración bajo el control del promotor *eryA* cromosómico.

(ii) *Producción realizada de eritromicinas y sus precursores usando NRRL2338/pCJRTE de S. erythraea (pCJR30)*

Se inocula NRRL2338/pCJRTE de *S. erythraea* (pCJR30) en medio sacarosa-succinato que contiene 50 µg/ml de tioestreptona y se deja crecer durante cuatro días a 30°C. Después de este tiempo, el caldo se filtra para eliminar los micelios y luego se extrae dos veces con un volumen igual de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se analizan por espectrometría de masas y se encuentra que la mezcla contiene la eritromicina A, acompañado por 6-DEB, (Ac)-DEB, TKL y (Ac)-TKL, en cantidades totales de 100 mg/L, o 5 veces la cantidad total de eritromicinas y los precursores de eritromicinas que se obtienen usando NRRL2338 de *S. erythraea* en las mismas condiciones.

## ES 2 337 424 T3

### Ejemplo 74

#### *Construcción y uso de S. erythraea JC2/pCJRTE (pCJR30)*

##### 5 (ii) *Construcción*

Aproximadamente 5 µg del plásmido pCJRTE (pCJR30) se transforman en protoplastos de *S. erythraea* JC2 y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado específicamente en la parte del gen de eryAIII que codifica la tioesterasa/ciclasa del extremo C-terminal, mediante recombinación homóloga.

##### (ii) *Producción realizada de triquetida lactonas usando JC2/pCJRTE de S. erythraea (pCJR30)*

Se inocula JC2/pCJRTE de *S. erythraea* (pCJR30) en medio sacarosa-succinato que contiene 50 µg/ml de tioestreptona y se deja crecer durante cuatro días a 30°C. Después de este tiempo, el caldo se filtra para eliminar los micelios y luego se extrae dos veces con un volumen igual de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se analizan por espectrometría de masas y RMN y se encuentra que el producto principal es TKL, y el producto minoritario (Ac)TKL, en rendimientos totales (100 mg/L) 10 veces mayor que el obtenido usando TER43 de *S. erythraea*.

### 20 Ejemplo 75

#### *Construcción y uso de NRRL2338/pIG1 de S. erythraea*

##### 25 (i) *Construcción*

Aproximadamente 5 µg del plásmido pIG1 se transforman en protoplastos de NRRL2338 de *S. erythraea* y se aíslan las colonias estables resistentes a la tioestreptona. A partir de diversas colonias, se obtiene el ADN total y se analiza por hibridación Southern, para confirmar que el plásmido se ha integrado específicamente en la parte del gen de eryAIII que codifica la tioesterasa/ciclasa del extremo C-terminal, mediante recombinación homóloga.

##### (ii) *Producción de lactonas de 14 miembros usando NRRL/pIG1 de S. erythraea*

Se inocula NRRL/pIG1 de *S. erythraea* en medio de agua del grifo que contiene 50 µg/ml de tioestreptona y se deja crecer durante cuatro días a 30°C. Después de esto, se usan 20 ml de micelio para sembrar 500 ml de medio sacarosa-succinato que contienen 50 µg/ml de tioestreptona, en un matraz de 2L con un muelle sencillo para reducir la aglutinación, se agita a 280 revoluciones por minuto. Después de entre 3,5 y 6 días, el caldo se filtra para eliminar los micelios y luego se extrae tres veces con un cuarto volumen de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo combinados se secan sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente se elimina por evaporación. El análisis de la mezcla de producto usando GC y MS electropulverización reveló que de un total de 5-6 mg/L de productos de macrólido de 14 miembros, el componente principal fue (s-pent)-eritromicina D (aproximadamente 1,5 mg/L), siendo otros componentes presentes (s-pent)-eritromicina B y (s-pent)-eritromicina A; (i-but)-eritromicinas A, B y D; y pequeñas cantidades de las eritromicinas naturales A, B y D. Los extractos también contuvieron cantidades significativas (11 mg/l) de las TKL: (s-pent)-TKL (5 mg/l), (i-but)-TKL y TKL. (NB s-pent e i-but indicaban las cadenas secundarias 1-metilpropilo e isopropilo, respectivamente, correspondiente al uso de sustratos iniciadores s-2-metilbutilo e i-butanilo).

### 50 Ejemplo 76

#### *Determinación de la actividad antibiótica de nuevos análogos de eritromicina*

Se cultivaron durante una noche 3 ml de cultivo ATCC 6633 de *Bacillus subtilis* a 30°C en caldo nutritivo (Difco). Se sembraron 200 ml de agar-agar nutritivo al 1,5% (difco) a 46°C con 1 ml de cultivo de *B. subtilis* y se vertió inmediatamente en placas petri (25 ml/placa). Después de secar las placas en una mampara de flujo laminar durante 15 minutos, los pocillos (0,4 mm de diámetro) se cortaron usando un perforador de corcho y se añadieron 20 microlitros del compuesto de prueba en forma de una disolución en etanol (5-10 mg/L) a cada pocillo. Las placas se guardaron a 4°C durante 5-7 horas para permitir que el compuesto se difundiera, y las placas se incubaron después durante una noche a 30°C. Las zonas claras de inhibición del crecimiento fueron vistas tanto con (i-but)- como con (s-pent)-eritromicina A.

Aunque la presente invención sea ilustrada mediante los ejemplos expuestos anteriormente, no se deberían considerar como una limitación del alcance de la invención. Las anteriores descripciones ilustran primero, cómo un promotor específico para un grupo de genes de PKS Tipo II, conectado a su gen activador cognado específico, al contrario de lo que se esperaba, puede usarse para conseguir una expresión controlada y potenciada de genes de PKS Tipo 1 en un huésped heterólogo. Los ejemplos de estos huéspedes que se proporcionan son *S. erythraea* y *S. avermitilis*, pero será evidente para los expertos en la técnica que huéspedes alternativos, representados por una amplia variedad de actinomicetos, servirán igualmente como huéspedes de la expresión. Del mismo modo, aunque se han usado el

promotor actI y su gen activador cognado actII-orf4 en estos Ejemplos, será evidente para los expertos en la técnica que se conocen y que están caracterizadas otras combinaciones del gen promotor/activador de PKS Tipo II que serán igualmente eficaces en la dirección de la expresión controlada y potenciada de genes de PKS Tipo I en células heterólogas representadas a partir de una amplia variedad de actinomicetos. Los ejemplos de tales combinaciones de gen promotor/activador incluyen a los promotores del grupo de genes *dnr* y al gen activador *dnrI* del grupo de genes daunorubicina de *Streptomyces peucetius*: (Madduri, R. y Hutchinson, C.R. *J. Bacteriol* (1995) **177**:1208-1215) y el promotor del gen *redX* y el gen activador *redD* del grupo de genes de undecilprodigiosina de *S. coelicolor* (Takano, E. *et al. Mol. Microbiol.* (1992) **2**: 2797-2804).

En segundo lugar, las anteriores descripciones ilustran por primera vez la construcción de genes de PKS Tipo I híbrida y su uso para obtener nuevos productos poliquétidos de utilidad como intermediarios sintéticos quirales o como materiales bioactivos como antibióticos. Los genes de PKS híbrida se han construido mediante la sustitución de módulos de carga, o mediante la sustitución de dominios individuales en los módulos de extensión; o mediante la sustitución de módulos enteros. Así, el reemplazo del módulo de carga de *ery* por el módulo de carga de *avr* se ha descrito en este documento para obtener tanto nuevos análogos de eritromicina como triquetida lactonas. Se sobrentiende fácilmente por los expertos en la técnica que pueden obtenerse otras modificaciones del módulo de carga de *ery* mediante su reemplazo por el módulo de carga de otros grupos de genes de PKS Tipo I. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen el reemplazo con el módulo de carga de la PKS de *rap*; y con el módulo de carga de la PKS productora de FK506. Tales modificaciones conducirán a la síntesis de poliquétidos específicamente modificados en su unidad iniciadora.

Los expertos en la técnica saben que el módulo de carga de *avr* es capaz de aceptar una amplia variedad de ácidos carboxílicos artificiales como unidades iniciadoras alternativas, cuando éstos son incluidos en el medio de fermentación. Por lo tanto, a la luz de la presente invención, es evidente que además de la síntesis de nuevos derivados de eritromicina A en los cuales el sustituyente C-13 es isopropilo o sec-butilo en vez de etilo, que se ha mostrado en este documento, pueden obtenerse muchos otros nuevos derivados de eritromicina A alimentando con los ácidos carboxílicos artificiales apropiados (o los compuestos convertibles en éstos mediante la fermentación) a una cepa apropiada que aloja la PKS híbrida, tales ácidos carboxílicos artificiales que tienen en general la fórmula R-COOH, donde R es un grupo alfa-ramificado, y donde el carbono que soporta el grupo -COOH también se une a al menos otros dos átomos o grupos además del hidrógeno, siendo los ácidos carboxílicos artificiales preferidos aquellos descritos para la producción de avermectinas artificiales en la patente europea EP 214,731, 18 de marzo de 1987, Pfizer). Los nuevos análogos que resultan de la eritromicina A se convierten, mediante procedimientos muy conocidos en la técnica, en otros nuevos derivados semisintéticos de eritromicina A, de considerable utilidad en el tratamiento de las infecciones bacterianas, incluyendo, por ejemplo, las quetolidas y azalidas. Estos son nuevos materiales quirales de potencial utilidad en la síntesis química de valiosos productos bioactivos. Los productos que son macrólidos de 14 miembros son nuevos análogos de eritromicina A que son agentes antibacterianos muy valiosos que tienen las mismas dianas microbianas que las eritromicinas conocidas y los derivados semisintéticos de eritromicinas conocidas, como las quetolidas descritas en las patentes francesas N<sup>os</sup>. 2697523 (06/05/94) Roussel Uclaf; 269724 (06/05/94) Roussel Uclaf; y 2702480 (16/09/94) Roussel Uclaf.

Será evidente para los expertos en la técnica que el reemplazo del módulo de carga de *ery* por el módulo de carga de la PKS de *rap* también conducirá a nuevos análogos útiles de la eritromicina A, en el que la unidad iniciadora del propionato natural es sustituida por una unidad iniciadora del ácido cicloalquilcarboxílico. Otros ejemplos de la formación de dicha PKS Tipo I híbrida incluyen, pero no están limitados, al reemplazo del módulo de carga de *rap* en *Streptomyces hygroscopicus* por el módulo de carga de *avr*, conduciendo a la formación de rapamicinas artificiales; y el reemplazo del módulo de carga de *avr* en *Streptomyces avermitilis* por el módulo de carga de *rap*, conduciendo a la formación de otros ejemplos de avermectinas artificiales. La presente invención también abarca a mutantes en los que más de una de las manipulaciones genéticas descritas en los ejemplos son combinadas.

A la luz de la presente invención, también será evidente que las modificaciones en la especificidad del módulo de carga de una PKS Tipo I pueden o bien ser conseguidas mediante la mutación de los genes que codifican el módulo de carga natural, y luego seleccionando según la especificidad modificada deseada, como poniendo en práctica, por ejemplo, la técnica del barajado de genes *in vitro* (Stemmer, W. P. *Nature* (1994) **370**:389-391).

Los ejemplos expuestos anteriormente también muestran la construcción y el uso de un vector de plásmido de número de copia bajo pCJR101 como un vector para la administración de genes de PKS en huéspedes de actinomicetos adecuados. El plásmido pCJR101 se deriva del plásmido SCP2\* (Bibb, M. J. y Hopwood, D. A. *J. Gen. Microbiol.* (1977) **154**:155-166) encontrado en la cepa M110 de *Streptomyces coelicolor* depositada, por ejemplo, en el Laboratorio de Investigación Northern Regional, Peoria, Illinois, EE.UU. con el número de entrada NRRL 15041. El plásmido SCP2\* se ha usado previamente en la construcción de varios vectores útiles tales como pIJ2839 (Ingram, C. *et al. J. Bacteriol.* (1989) **171**:6617-6624); el plásmido pHJL197 (Larson, J. L. y Hershberger, C. L. *J. Bacteriol.* (1983) **157**:314-317) y pRM5 (McDaniel, R. *et al. Science* (1993) **262**:1546-1550). Será evidente para los expertos en la técnica que éstos u otro plásmidos basados en SCP2\* pueden ser sustituidos por pCJR101 directamente o después de la modificación del vector para presentar al promotor adecuado unido a los genes de PKS, como se demuestra por el uso del plásmido pRM5 en varios Ejemplos descritos en este documento. Los vectores con número de copia alto, tales como el plásmido pGM8 (Muth, G. *et al. Mol. Gen. Genet.* (1989) **219**:341-350) derivado del plásmido pGS5 de *Streptomyces ghanaensis*, son también adecuados como sustitutos de pCJR101, ya que son vectores integrantes, tales como el plásmido pSAM2 (Murakami, T. *et al. J. Bacteriol.* (1989) **171**:1459-14??). Los expertos en la técnica

apreciarán fácilmente el carácter versátil de los intentos para aumentar la tasa de biosíntesis de poliquétidos complejos naturales o artificiales tales como macrólidos y poliéteres a través del uso heterólogo de genes activadores de PKS tipo II y sus promotores cognados como se describe en este documento, en numerosos derivados de vectores conocidos en la técnica como útiles para la ingeniería genética en actinomicetos.

5

En la construcción de genes de PKS Tipo I híbrida, los Ejemplos muestran cómo los genes estructurales que codifican tanto los componentes donantes como aceptadores de PKS pueden empalmarse juntos para crear catalizadores funcionales capaces de originar la síntesis de nuevos poliquétidos. La presente invención muestra que sobre la elección donde se hará la unión entre el ADN donante y aceptador, sorprendentemente, no es necesario limitar la elección a posiciones conocidas o predeterminadas para estar entre dominios en las denominadas regiones enlazantes. En cambio, se prefiere que las uniones estén en las regiones limítrofes de los dominios (particularmente los dominios KS o AT), donde las secuencias están muy conservadas. Además, se tolera la creación de uniones que conducen a cambios conservadores de la secuencia de aminoácidos en tales uniones en el producto génico. También es evidente que con el fin de crear un híbrido, los módulos de PKS pueden ser combinados a partir de dos o más PKS naturales. En los ejemplos dados en este documento, el ADN donante se empalma en el ADN aceptador en una posición diversa en el dominio de la proteína portadora de acilo (ACP) o en el dominio de la cetosintasa (KS) de un módulo. Sin embargo, se apreciará que lo más ventajoso es seleccionar una posición para cada unión que esté dentro de un dominio, y cerca de un borde, de modo que la especificidad del módulo quimérico sea fácilmente previsible, y de modo que sea reducida al mínimo la perturbación de su funcionamiento apropiado.

20

Será fácilmente apreciado a la luz de la presente invención que puede construirse una PKS híbrida seleccionando trozos de ADN que codifiquen respectivamente un módulo de carga, un número variable de módulos de extensión hasta al menos seis en número y un dominio de tioesterasa liberador de cadena; y concadenando el ADN, usando procedimientos estándares, en el orden que se requiera para que los productos génicos funcionen. Nota: Las PKS híbridas con (digamos) 6 módulos pueden ser parte de un ensamblaje de sintasas que conducen a un producto producido por muchos más de 6 módulos de extensión. También será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que pueden ser constituidos los fragmentos de ADN con un tamaño de módulo en más de una forma. Por lo tanto, la presente invención incluye la construcción de PKS híbridas funcionales ejemplificadas por el constructo que contiene las actividades siguientes en una cadena polipeptídica sola:

30

ATO-ACPO-KS1-[ATR1-DHR1-ERR1-KRR1-ACPR1-KSR2]-AT2-KR2-ACP2-TE

donde las actividades mostradas en corchetes se derivan de los módulos 1 y 2 de la PKS de rap, y el resto se deriva del módulo de carga, módulos de extensión 1 y 2, y la tioesterasa terminadora de cadena de DEBS1. En tales constructos, cada dominio de cetosintasa se mantiene junto con ACP, AT y los dominios reductores del módulo que lo precede en las PKS naturales de las cuales se derivan, en vez de con las actividades de su propio módulo. Serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica otras disposiciones alternativas, pero igualmente funcionales, de los componentes básicos de ADN con el tamaño de módulo para la construcción de PKS híbridas.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un gen de poliquétido sintasa (“PKS”) híbrida que comprende:

- 5 (i) una primera parte de ácido nucleico o partes que codifican un módulo de carga, y opcionalmente también la cetosintasa (KS) en el principio del primer módulo de extensión siguiente, de una primera PKS tipo I; y
- 10 (ii) una segunda parte de ácido nucleico o partes que codifican al menos un dominio de un módulo de extensión de PKS tipo I de una segunda PKS tipo I,

en el que el módulo de carga, y opcionalmente también la cetosintasa (KS) en el principio del siguiente primer módulo de extensión, es de una PKS tipo I diferente a todos los módulos de extensión del gen de PKS híbrida.

15 2. Un gen de PKS híbrida que comprende una primera parte de ácido nucleico o partes de una primera PKS tipo I, y una segunda parte de ácido nucleico o partes de una segunda PKS tipo I que es diferente de dicha primera PKS en la que:

- 20 (i) dicha primera parte de ácido nucleico o partes codifican un módulo de carga de dicha primera PKS tipo I y opcionalmente el dominio de cetosintasa del primer módulo de extensión de dicha primera PKS tipo I;
- (ii) dicha segunda parte de ácido nucleico o partes codifican al menos un dominio de un módulo de extensión de PKS tipo I de dicha segunda PKS tipo I; y

25 en el que el sitio de empalme entre la primera parte de ácido nucleico y la segunda parte de ácido nucleico está localizado en la región enlazante entre el módulo de carga y el dominio de KS del primer módulo de extensión de la segunda PKS tipo I, en el principio del dominio de KS del primer módulo de extensión de la segunda PKS tipo I, en la región del final del dominio de KS del primer módulo de extensión de la primera PKS tipo I o en la región enlazante entre el dominio de KS del primer módulo de extensión de la primera PKS tipo I y el dominio AT del primer módulo de extensión de la segunda PKS tipo I.

30

3. Un gen de PKS híbrida según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho módulo de carga comprende una aciltransferasa y una proteína portadora de acilo.

35 4. Un gen de PKS híbrida según cualquiera de reivindicaciones 1-3, en el que dicha primera parte de ácido nucleico o partes codifican dicho módulo de carga sólo.

40 5. Un gen de PKS híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que en dicha primera PKS tipo I, dicho módulo de carga es seguido de un módulo de extensión que comienza con un dominio de cetosintasa (“KS”); y dicha primera parte de ácido nucleico codifica dicho módulo de carga junto con sólo dicho dominio de cetosintasa (“KS”) de dicho módulo de extensión de la primera PKS.

45 6. Un gen de PKS híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho módulo de carga es capaz de cargar un sustrato para producir una unidad iniciadora diferente de una unidad iniciadora de un poliquétido como se produce por dicha segunda PKS tipo I.

7. Una PKS híbrida según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicho módulo de carga es capaz de cargar cualquiera de una multiplicidad de unidades iniciadoras diferentes.

50 8. Un gen de PKS híbrida según la reivindicación 7, en el que dicho módulo de carga es un módulo de carga de avr.

9. Un gen de PKS híbrida según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho módulo de carga es un módulo de carga de rap.

55 10. Un gen de PKS híbrida según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho módulo de carga es un módulo de carga productor de FK506.

60 11. Un gen de PKS híbrida según cualquier reivindicación precedente, en el que al menos una de dichas partes de ácido nucleico codifica un módulo combinatorio, es decir una parte de ácido nucleico que se extiende en la primera o la segunda PKS tipo I entre dominios correspondientes de dos módulos naturales.

12. Un gen de PKS híbrida según cualquier reivindicación precedente, incluyendo el ácido nucleico que codifica una enzima terminadora de cadena, además de la tioesterasa.

65 13. El ácido nucleico que codifica un gen según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 operativamente unido a un promotor de PKS tipo II.

## ES 2 337 424 T3

14. El ácido nucleico que codifica un gen según la reivindicación 13, en el que el promotor está acompañado por su gen activador natural.

15. El ácido nucleico según la reivindicación 13, en el que el promotor es act I de *S. coelicolor*.

16. El ácido nucleico según la reivindicación 15, en el que el promotor está acompañado por el activador ActII-orf4 de *S. coelicolor*.

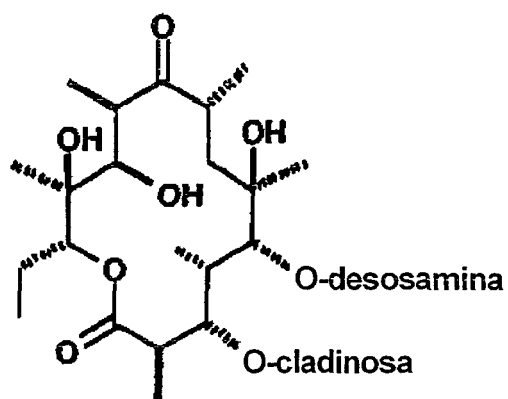
17. Una poliquétido sintasa híbrida como la codificada por un gen según cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

18. Un vector que incluye un gen o ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-16.

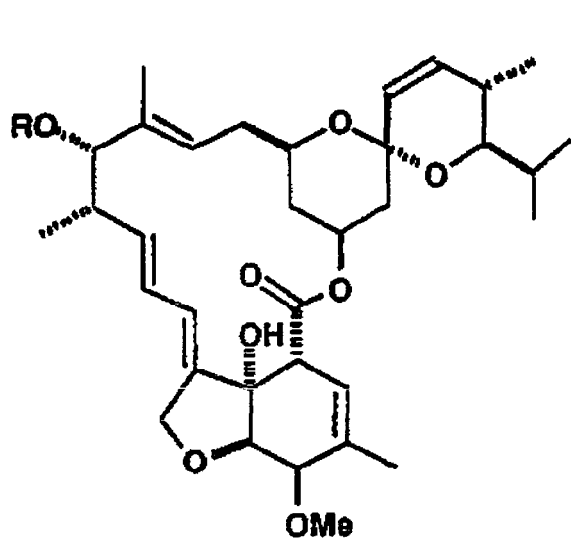
19. Una bacteria filamentosa transformada que contiene un gen o ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1-15 y capaz de expresar una poliquétido sintasa codificada por éste.

20. Un método para producir una bacteria filamentosa transformada como se define en la reivindicación 19 que comprende la etapa de introducir un plásmido que contiene el ADN 'donante' en una célula huésped en condiciones tal que hay recombinación homóloga con el ADN de la PKS cromosómico heterólogo.

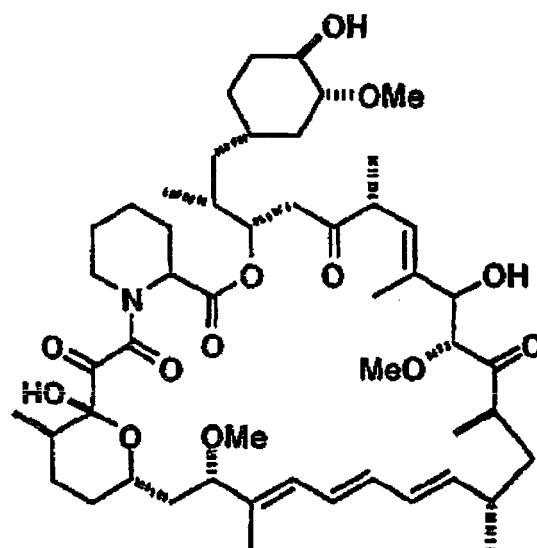
21. Un método para preparar un poliquétido cultivando la bacteria filamentosa de la reivindicación 19.



**Eritromicina A**



**Avermectina A1 b**



**Rapamicina**

**Figura 1.**

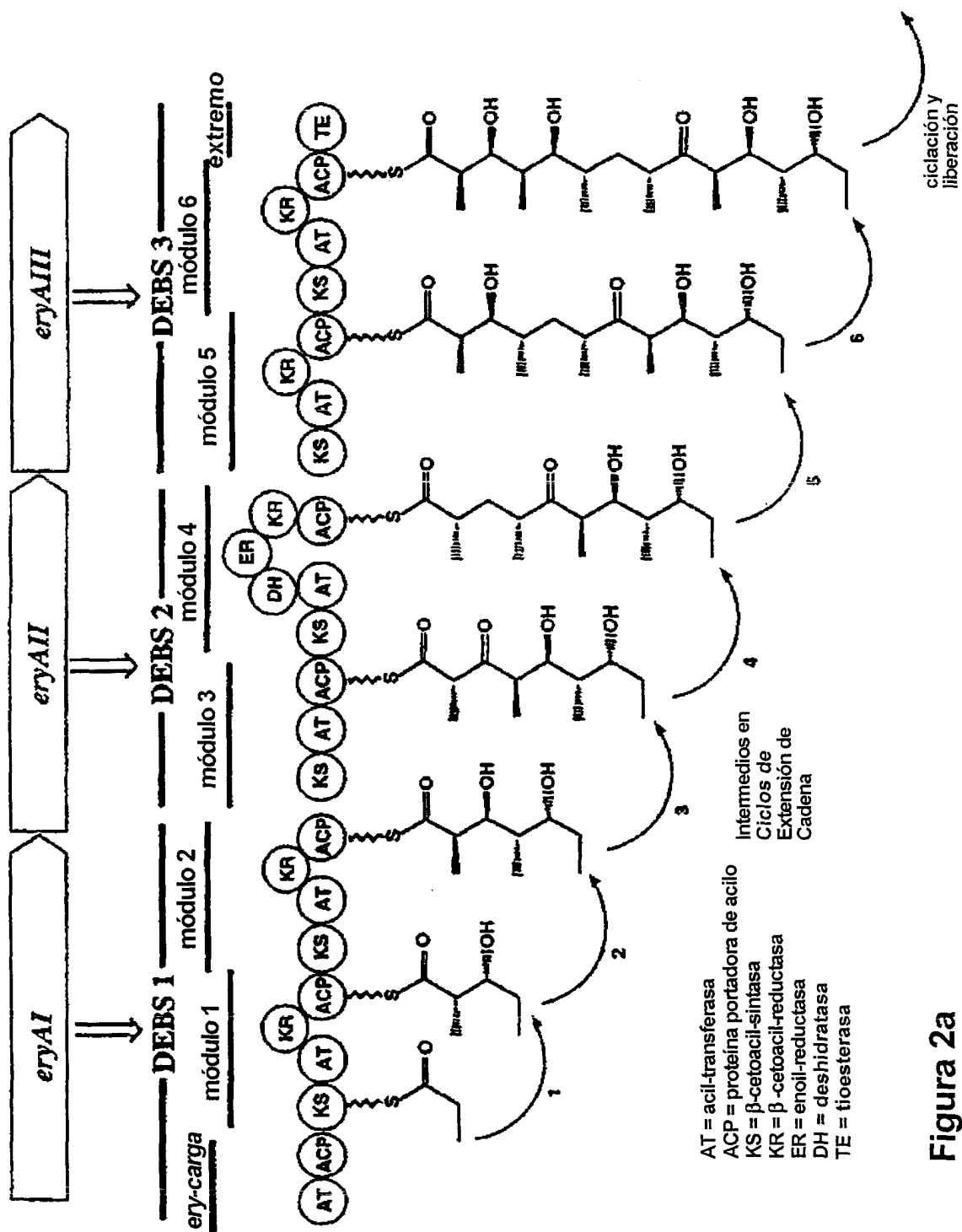


Figura 2a

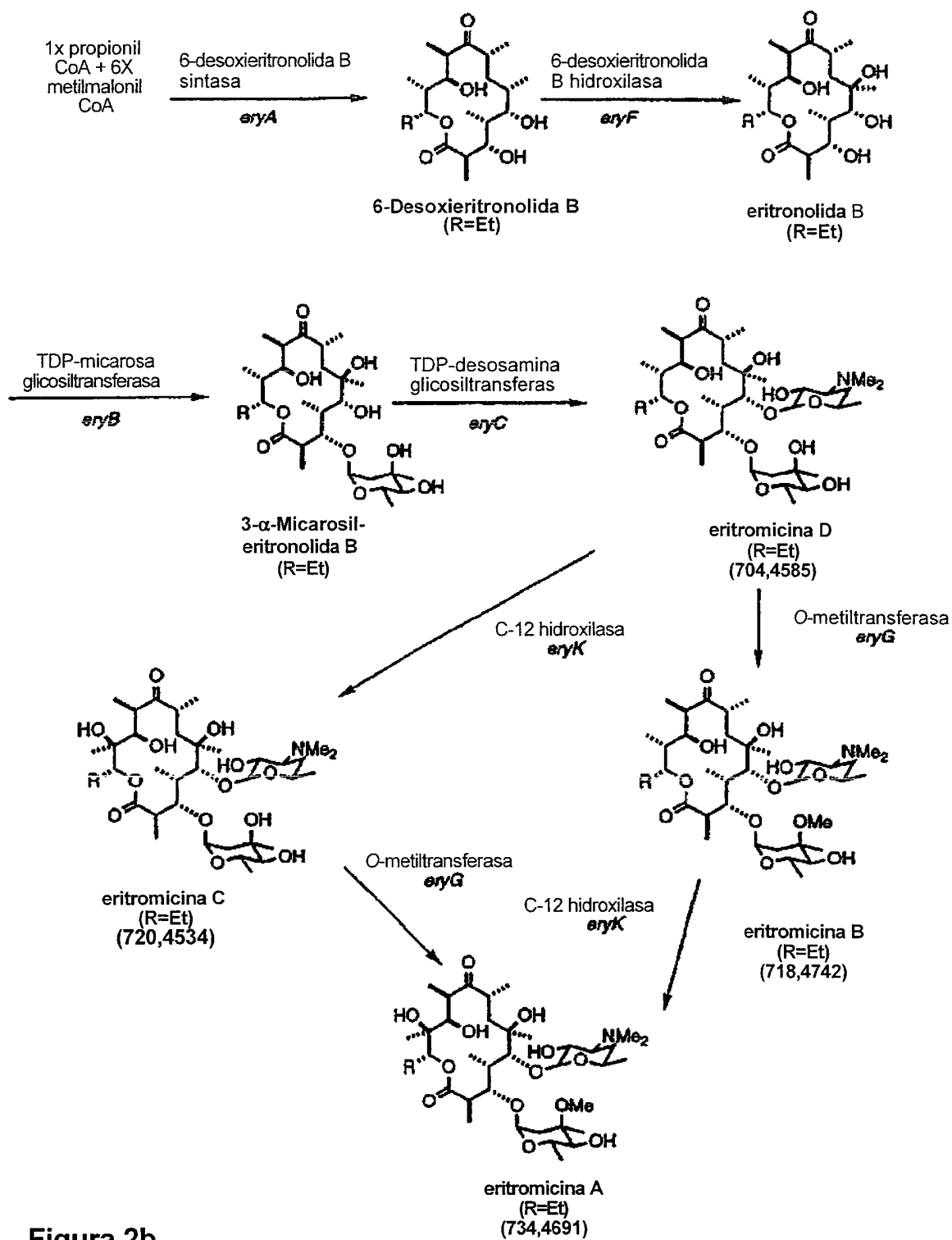


Figura 2b.

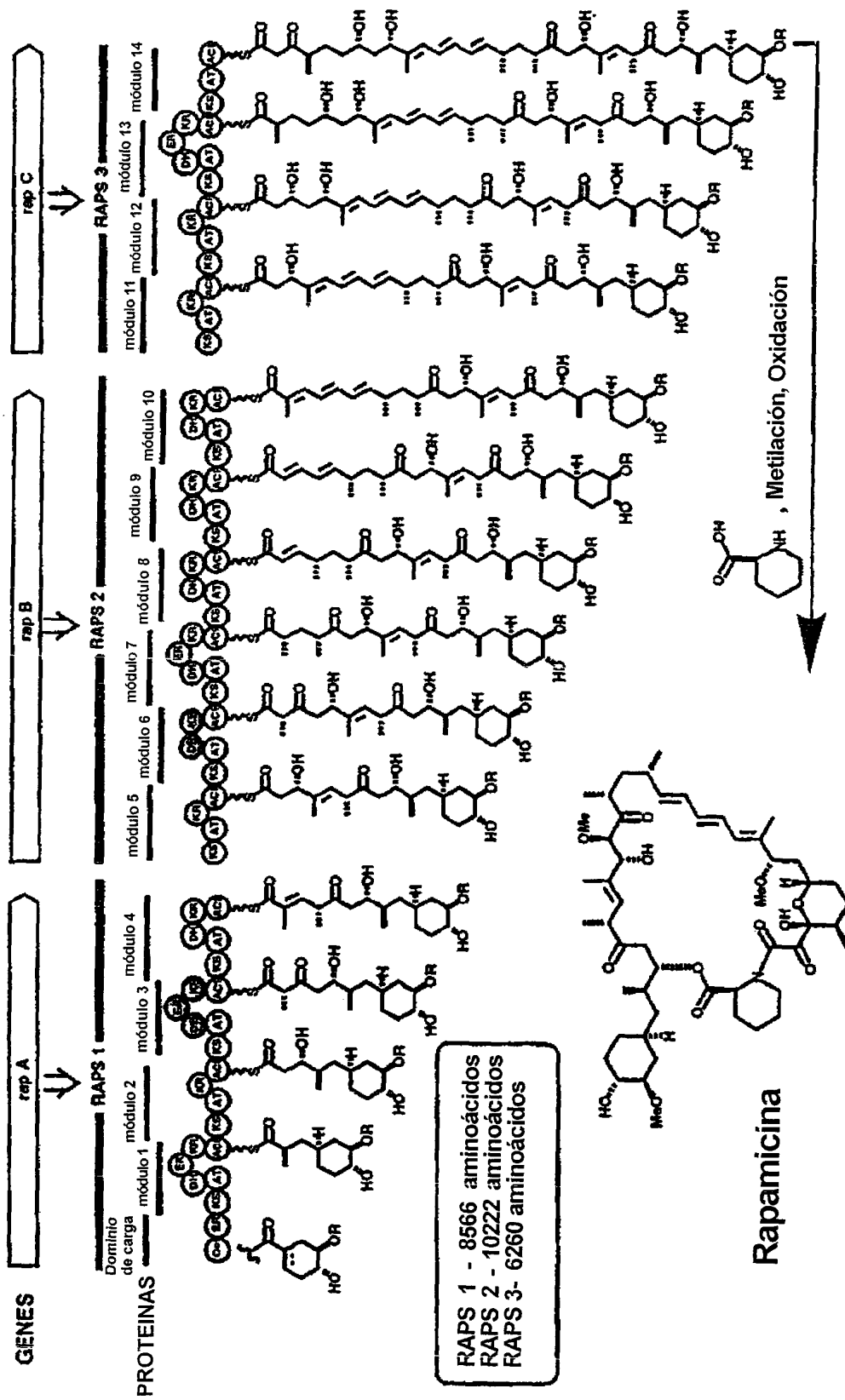


Figura 3

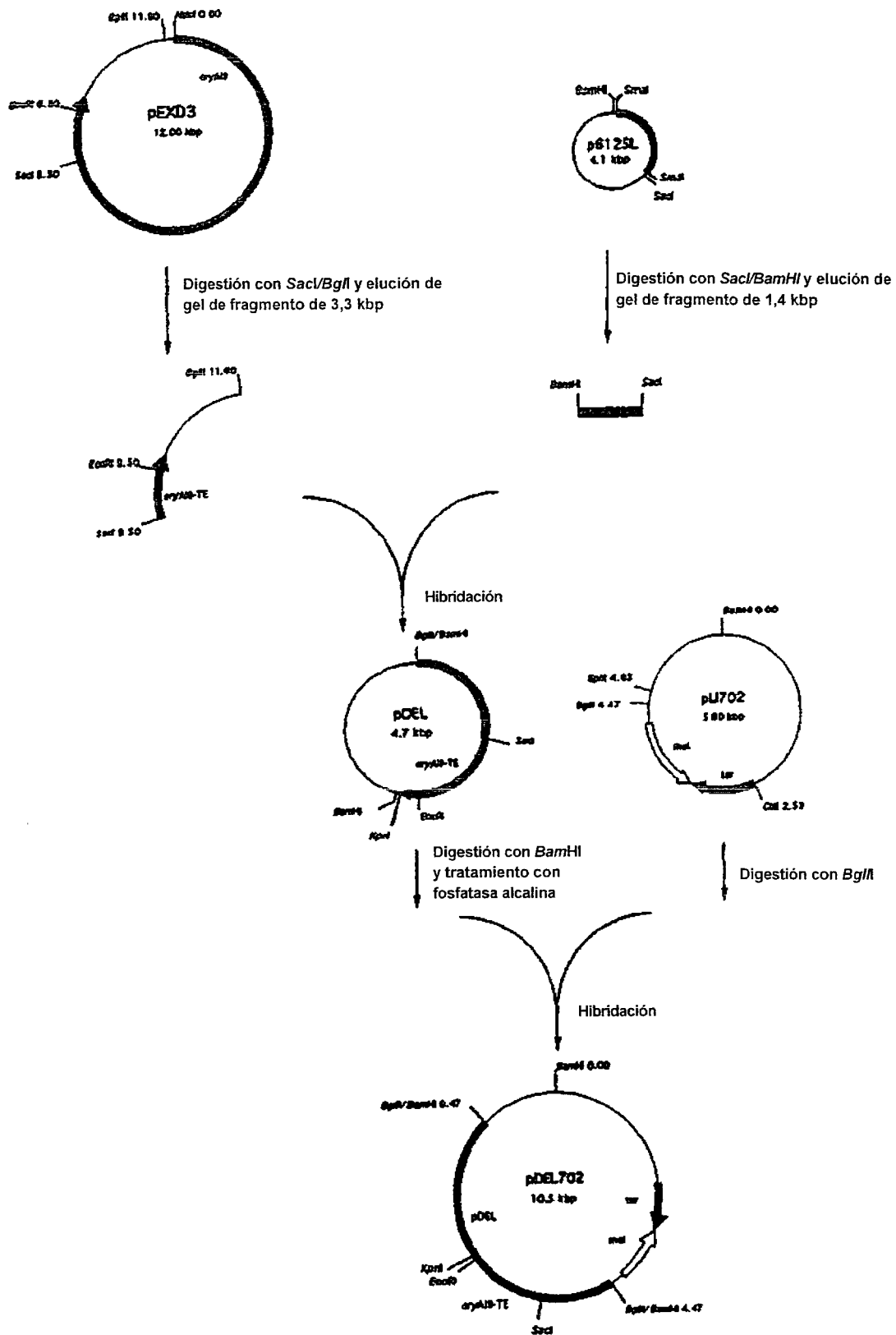


Figura 4

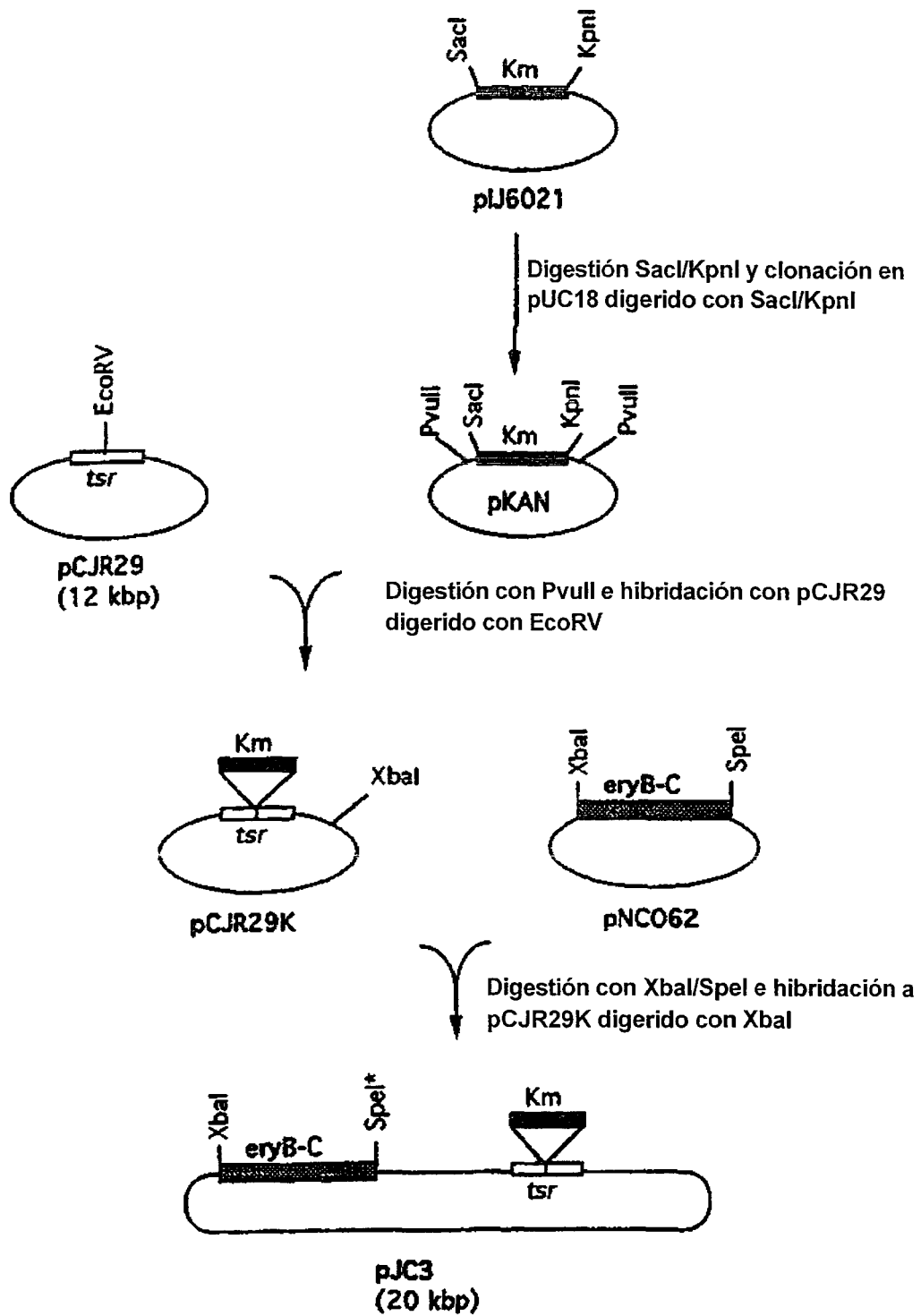


Figura 5. Construcción de pJC3

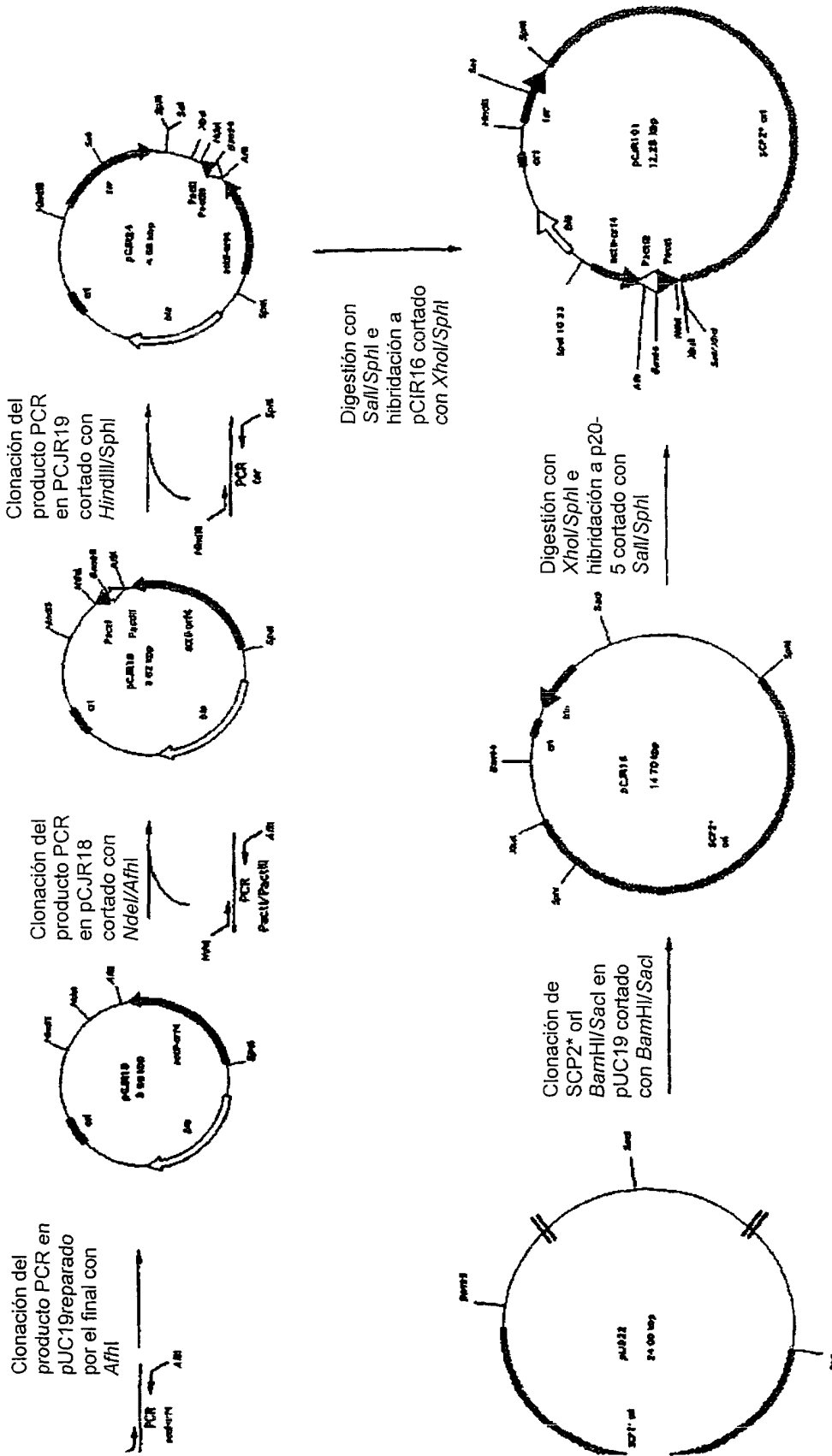


Figura 6

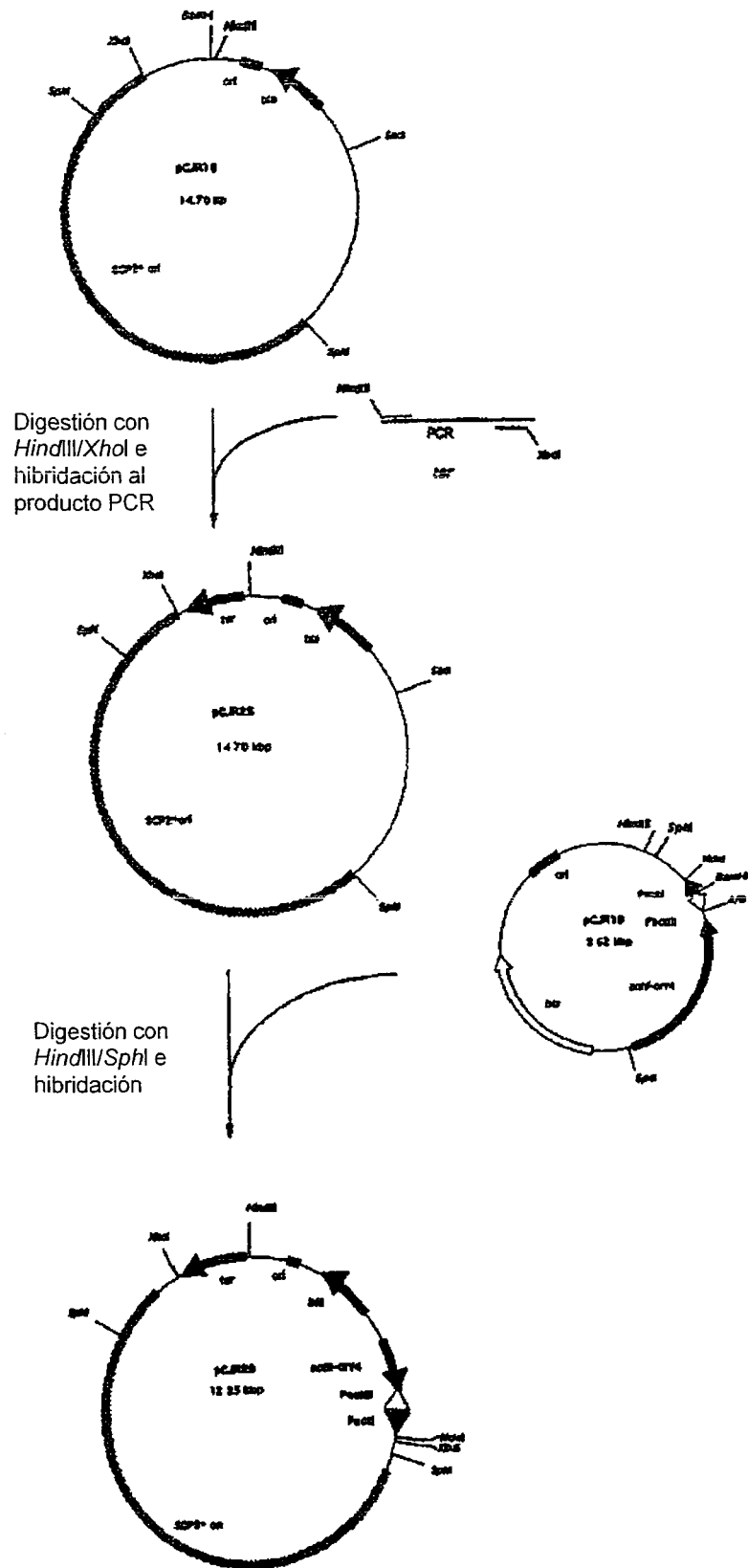


Figura 7

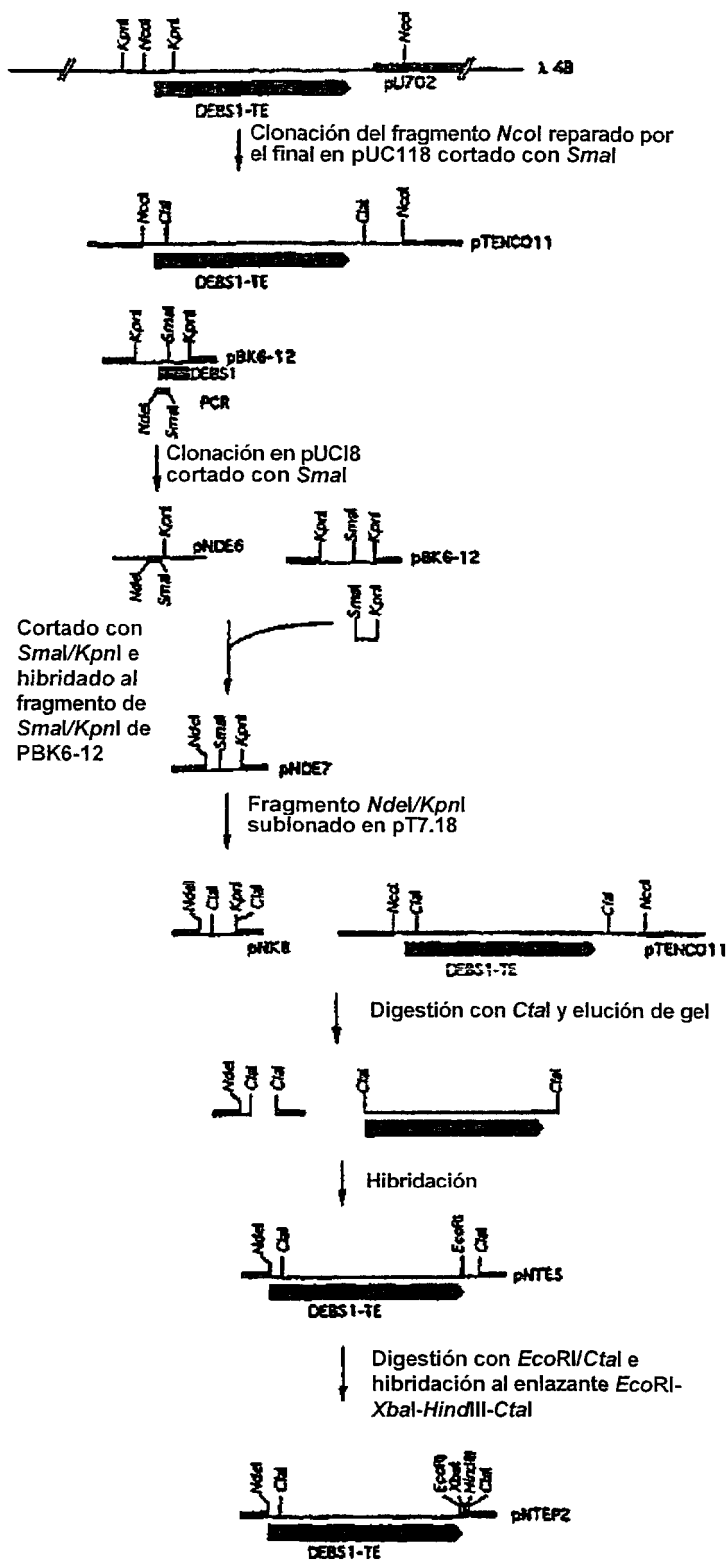


Figura 8



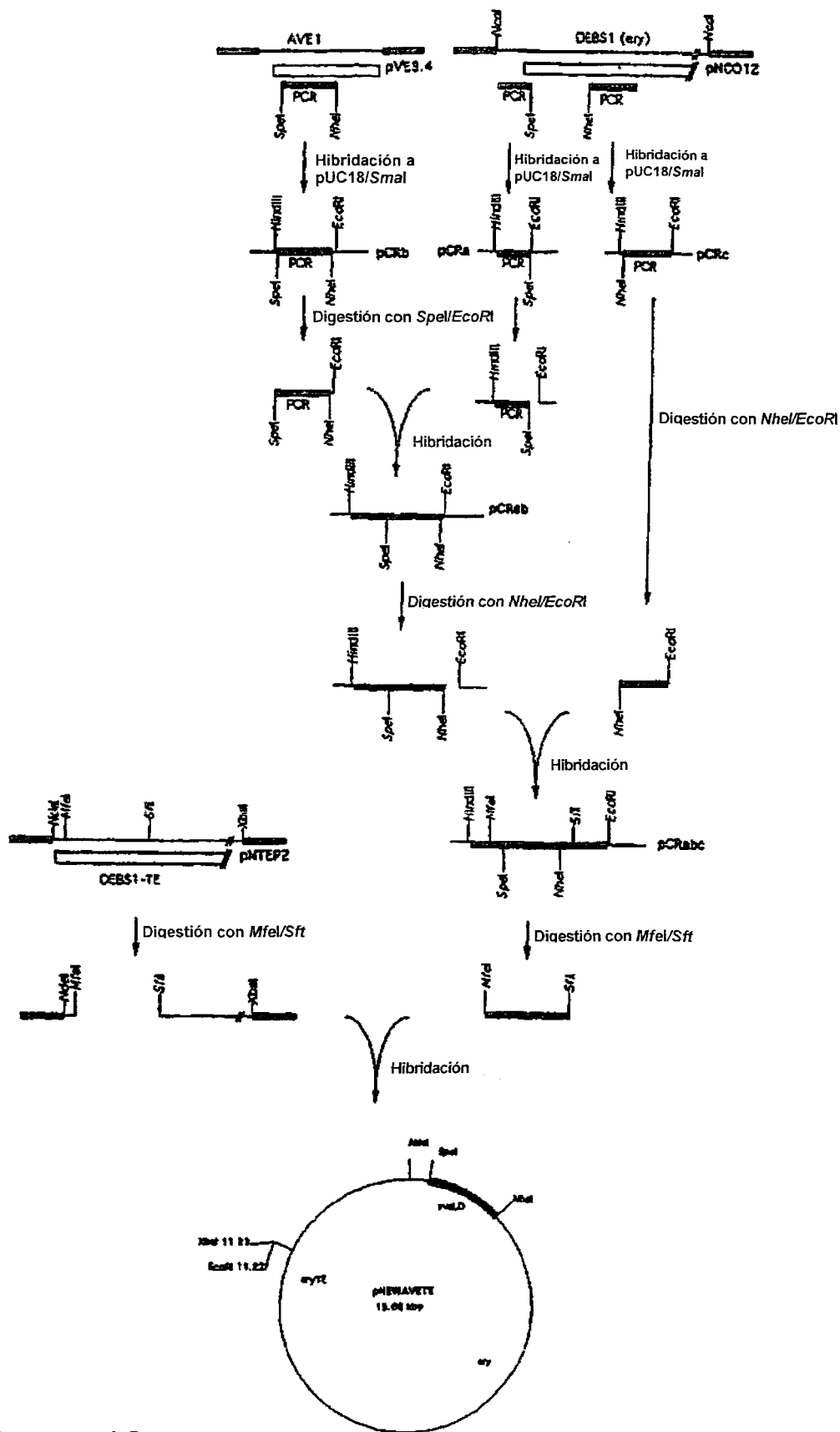


Figura 10 a.



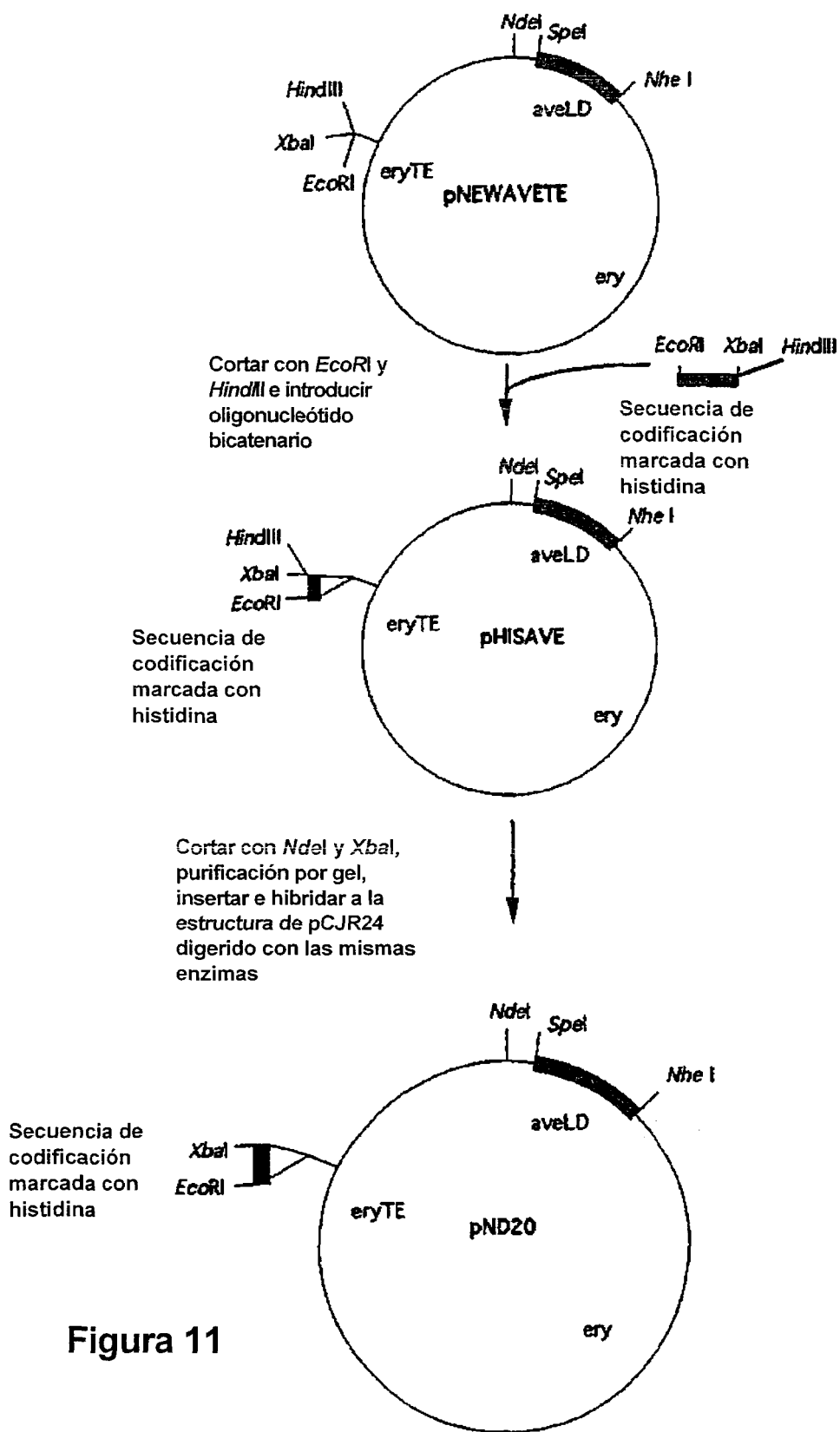


Figura 11

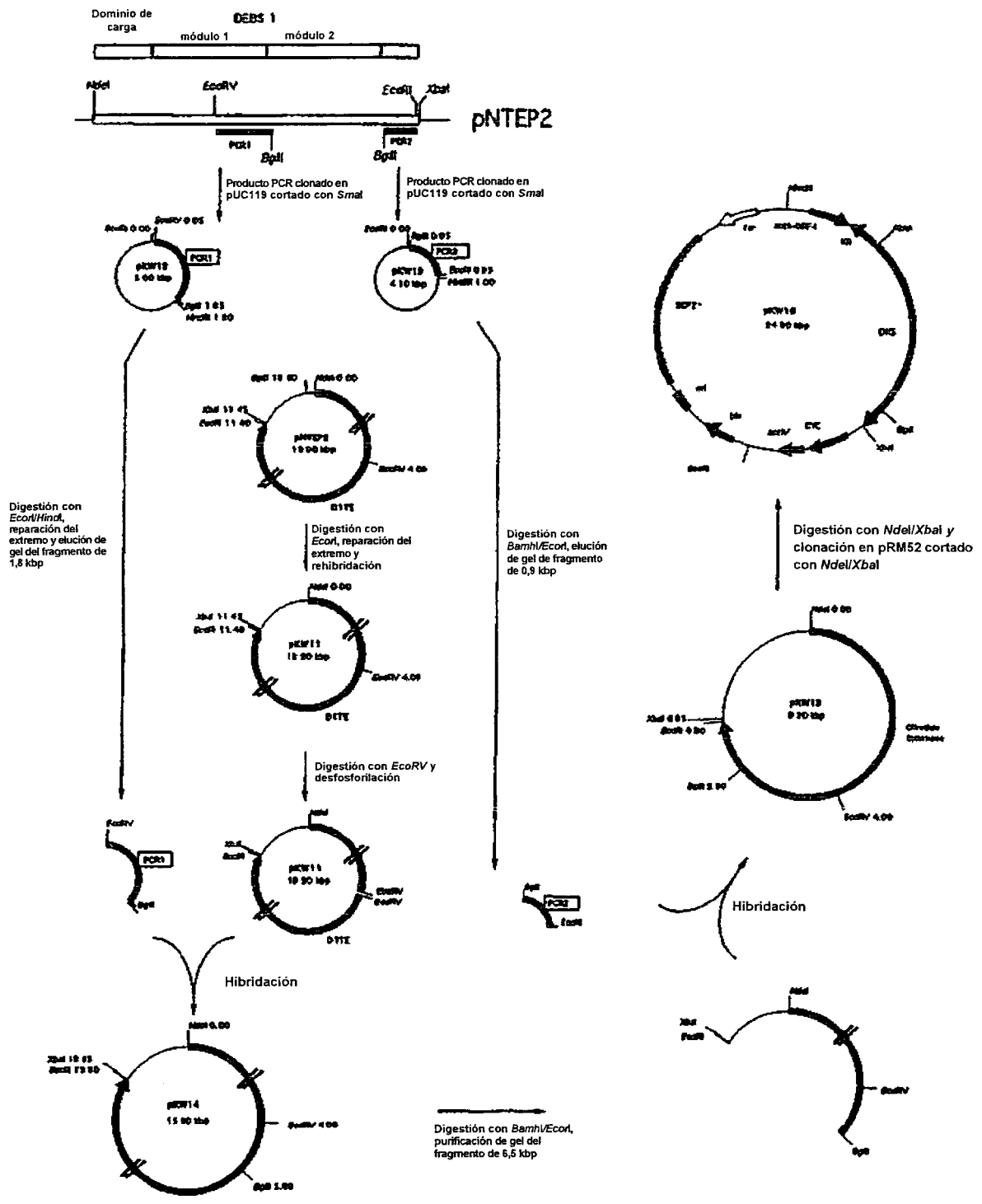


Figura 12.







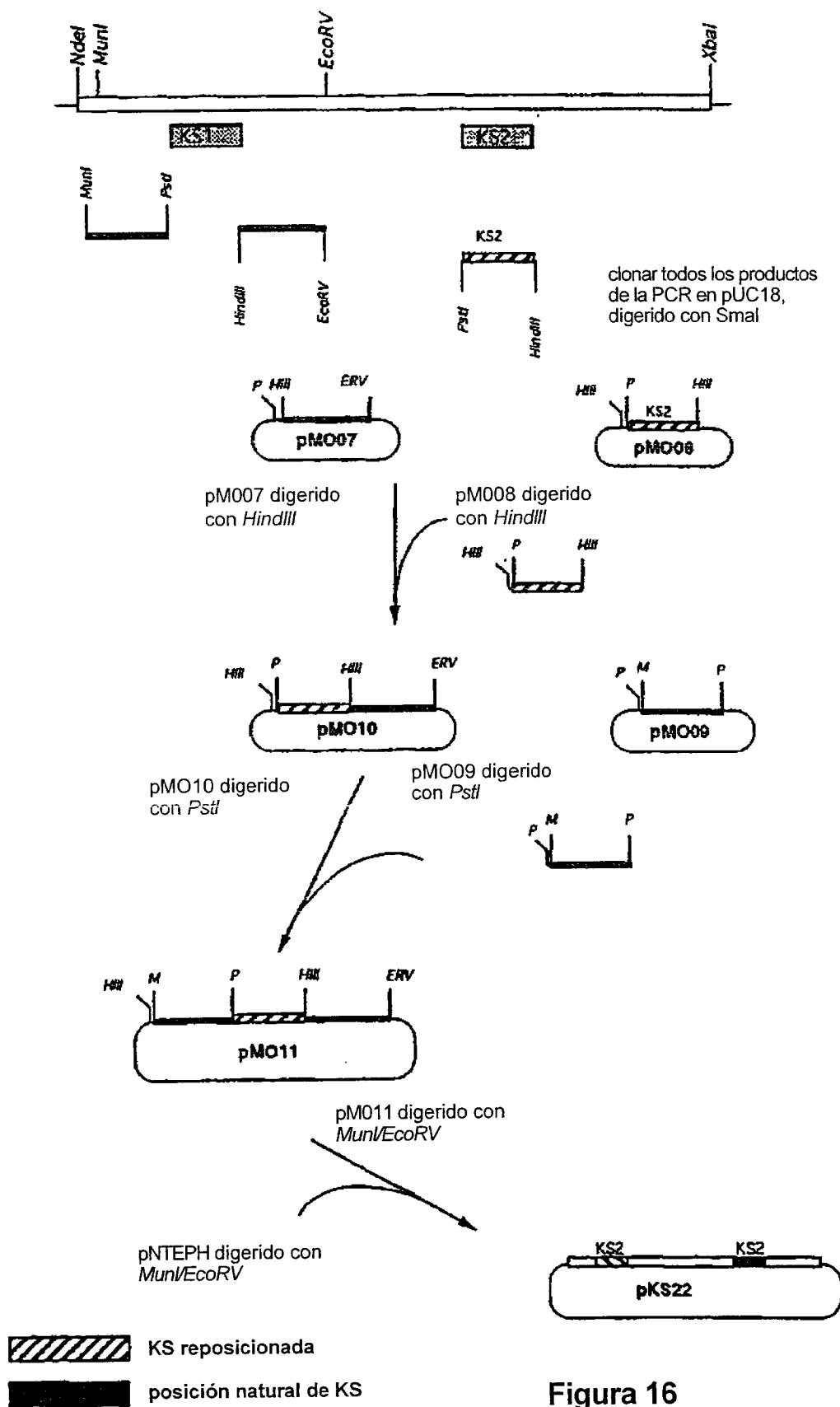


Figura 16

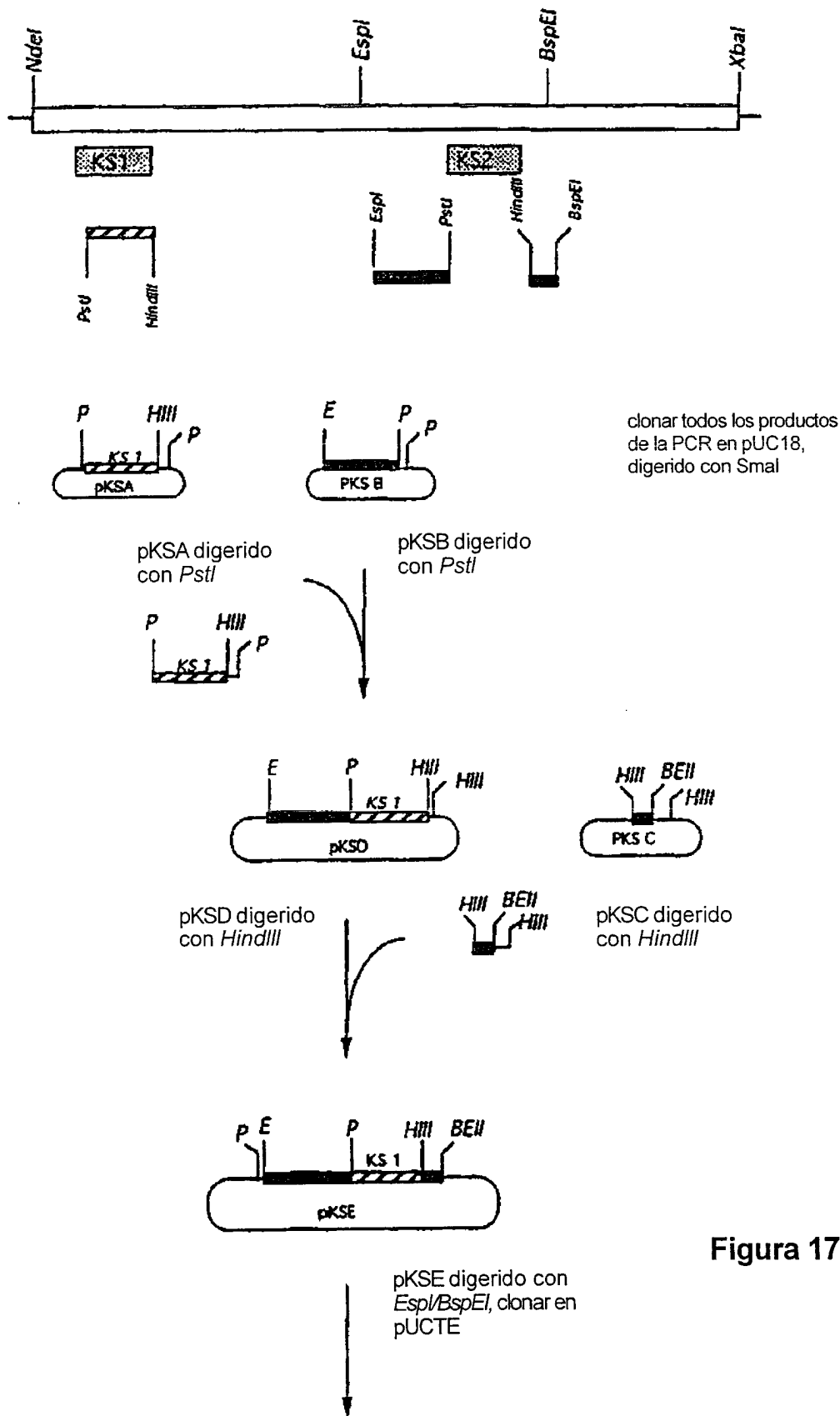


Figura 17a

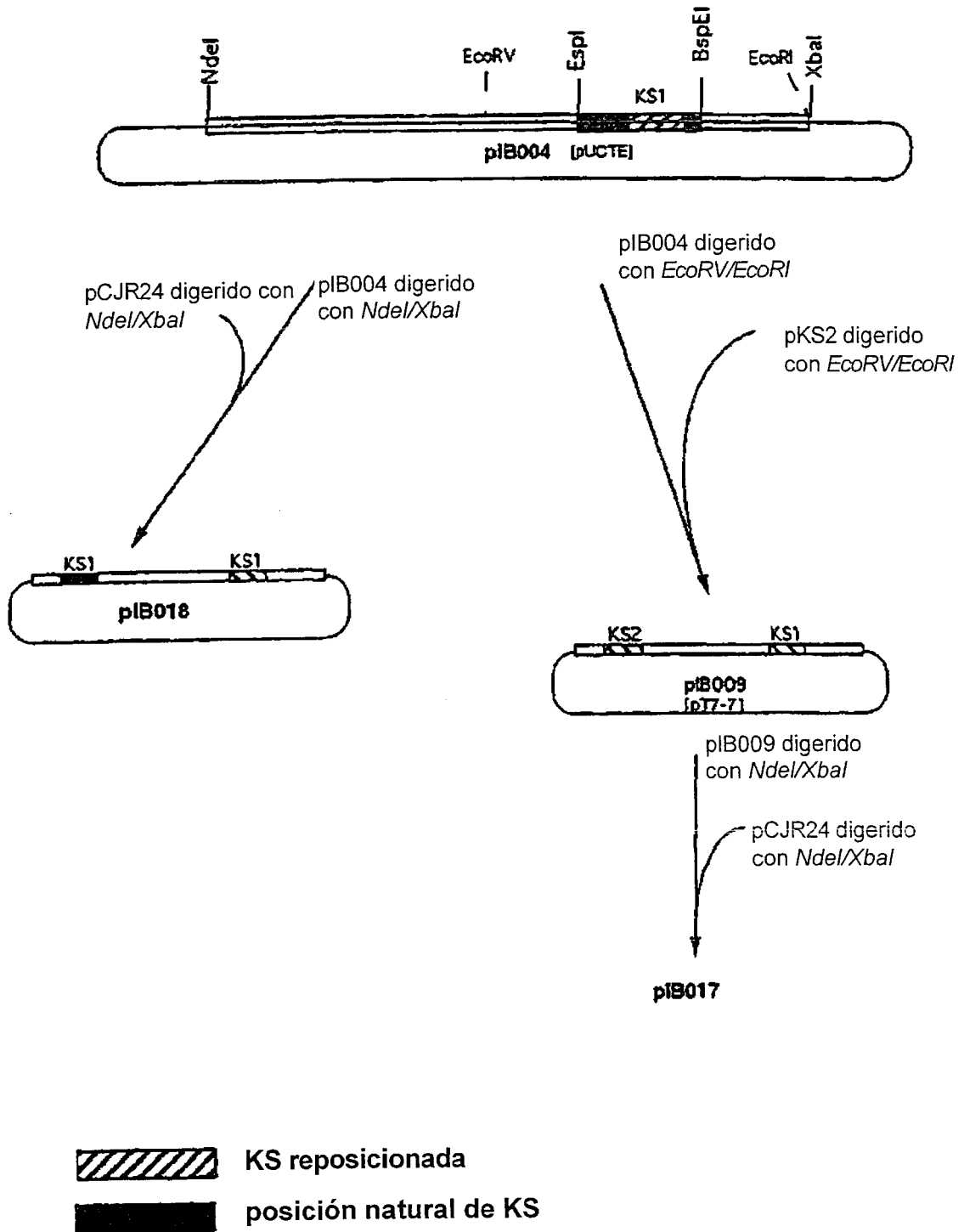


Figura 17b

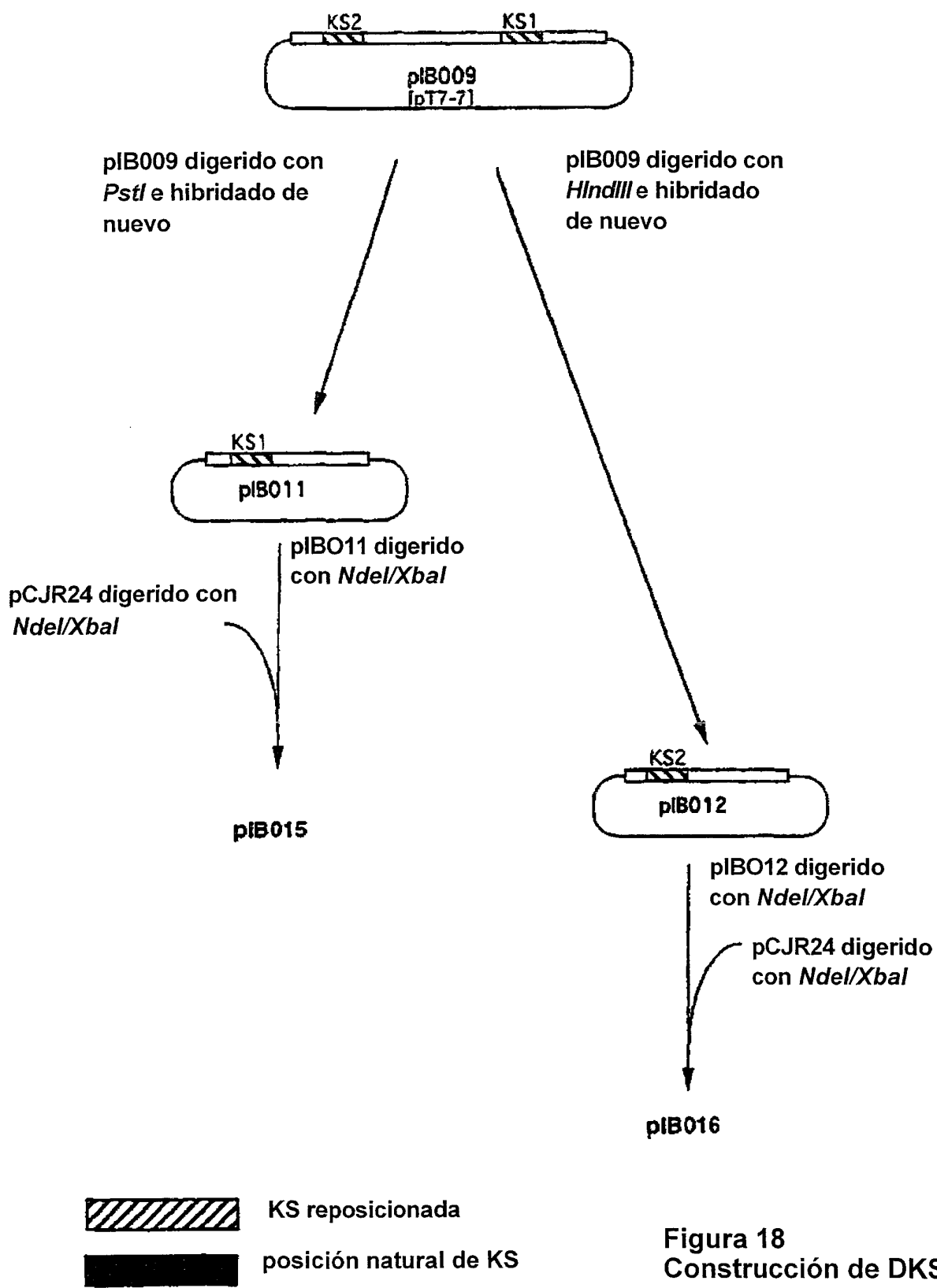


Figura 18  
Construcción de DKs

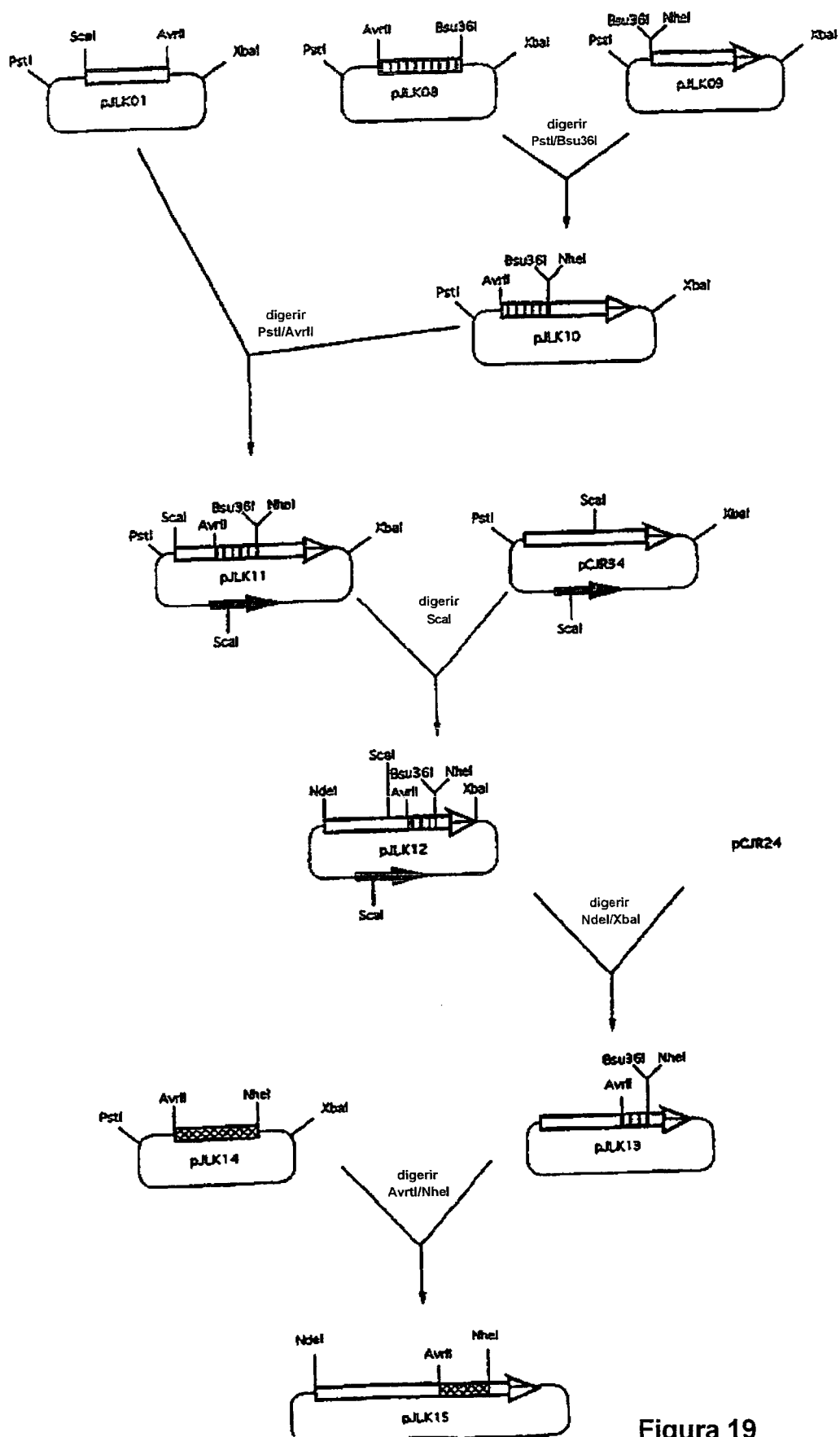


Figura 19

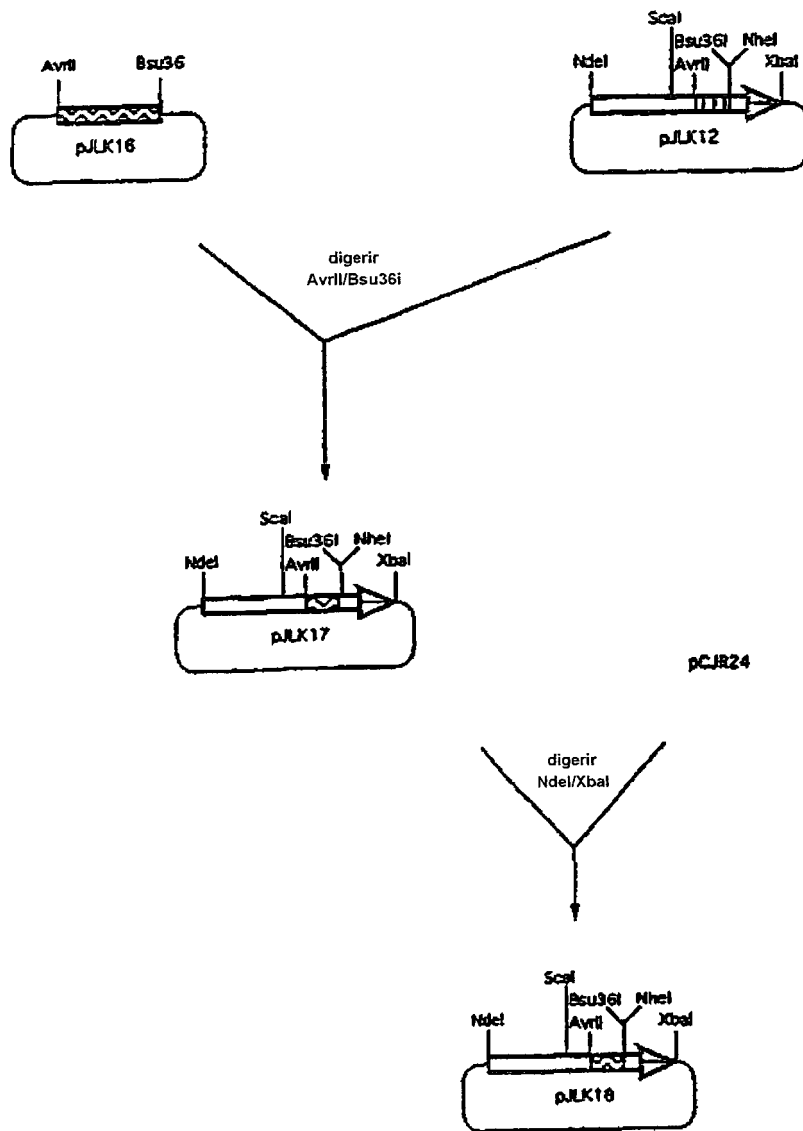
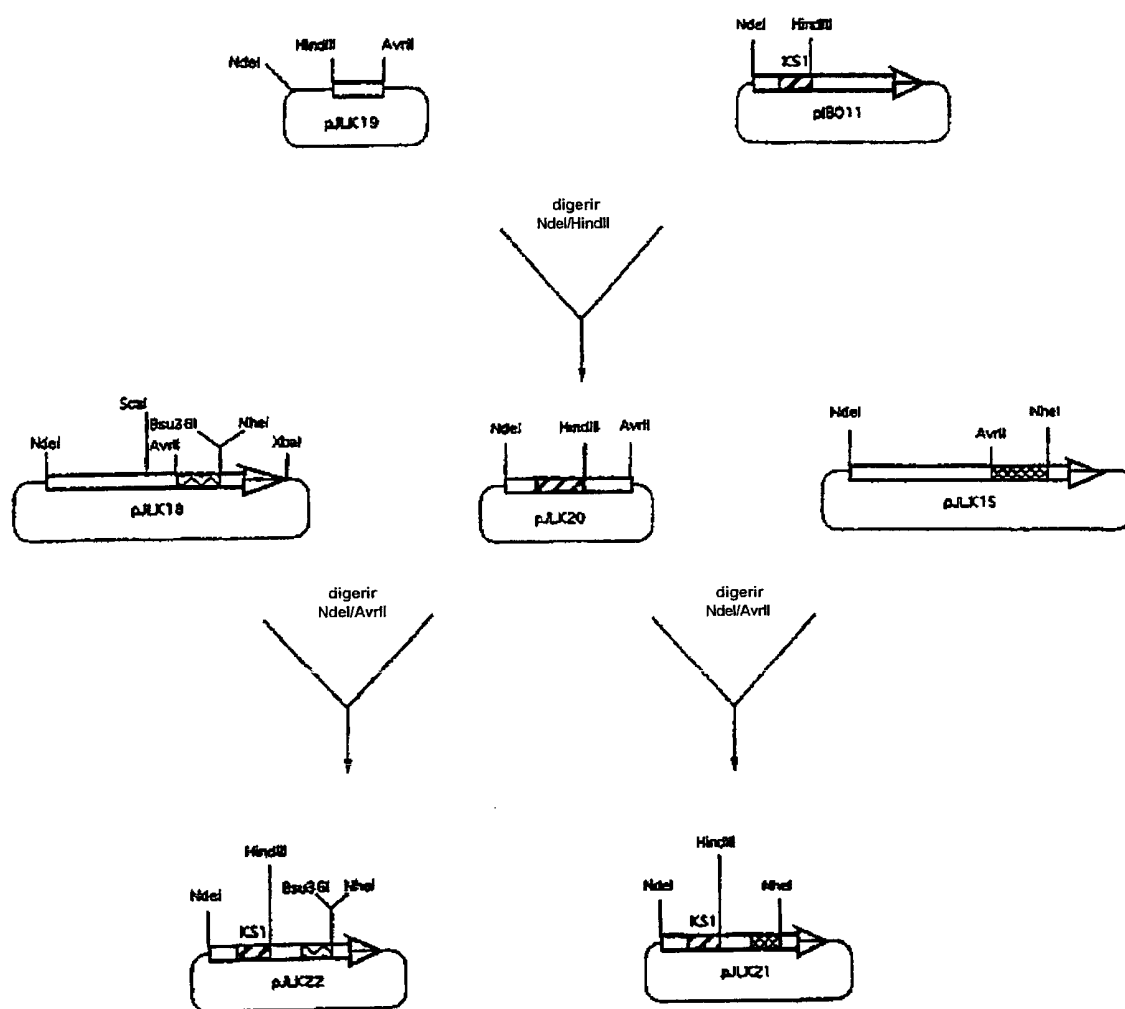


Figura 20

Figura 21

Construcción de una diquetida sintasa con diferentes bucles reductores



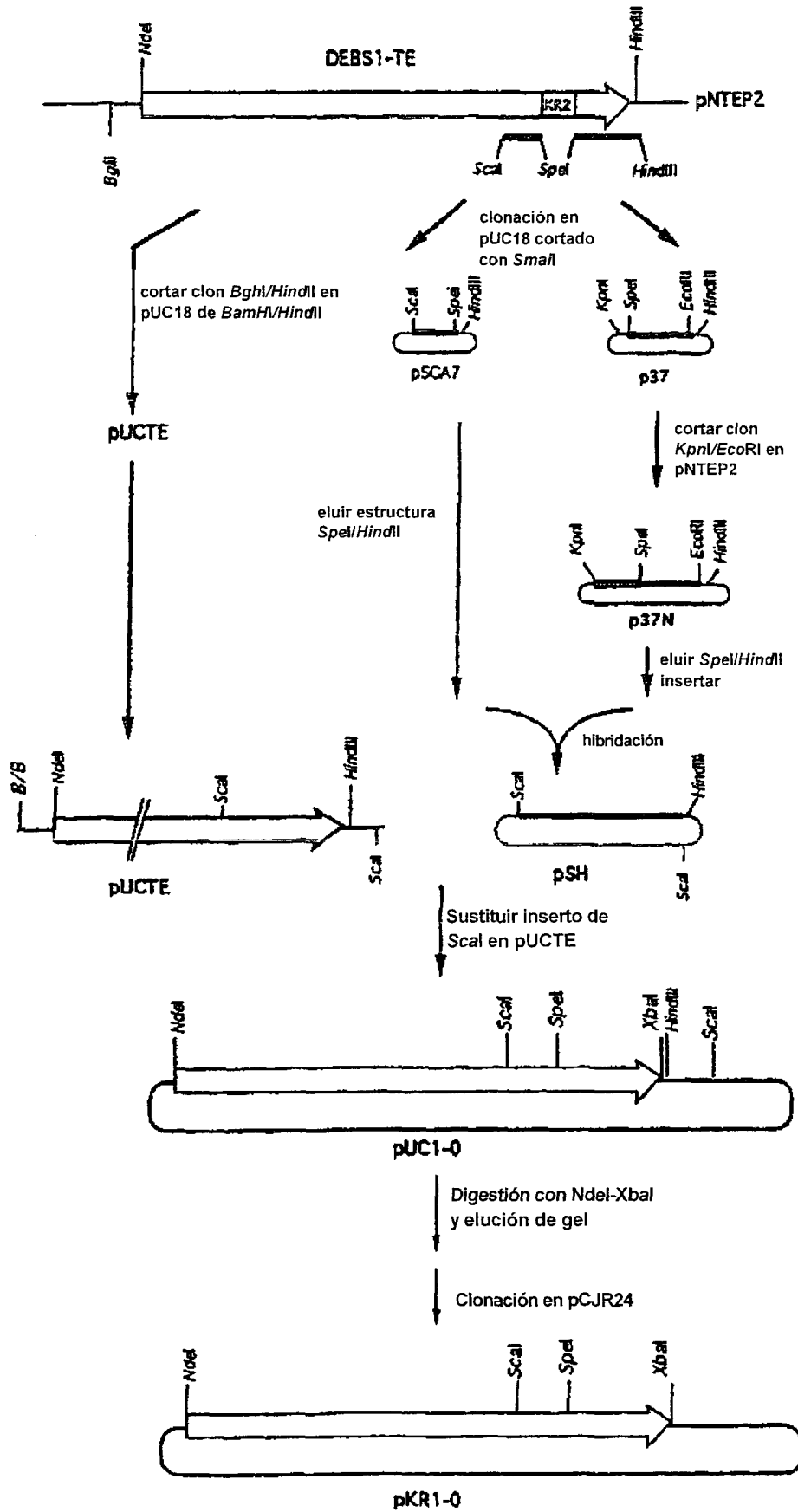


Fig. 22

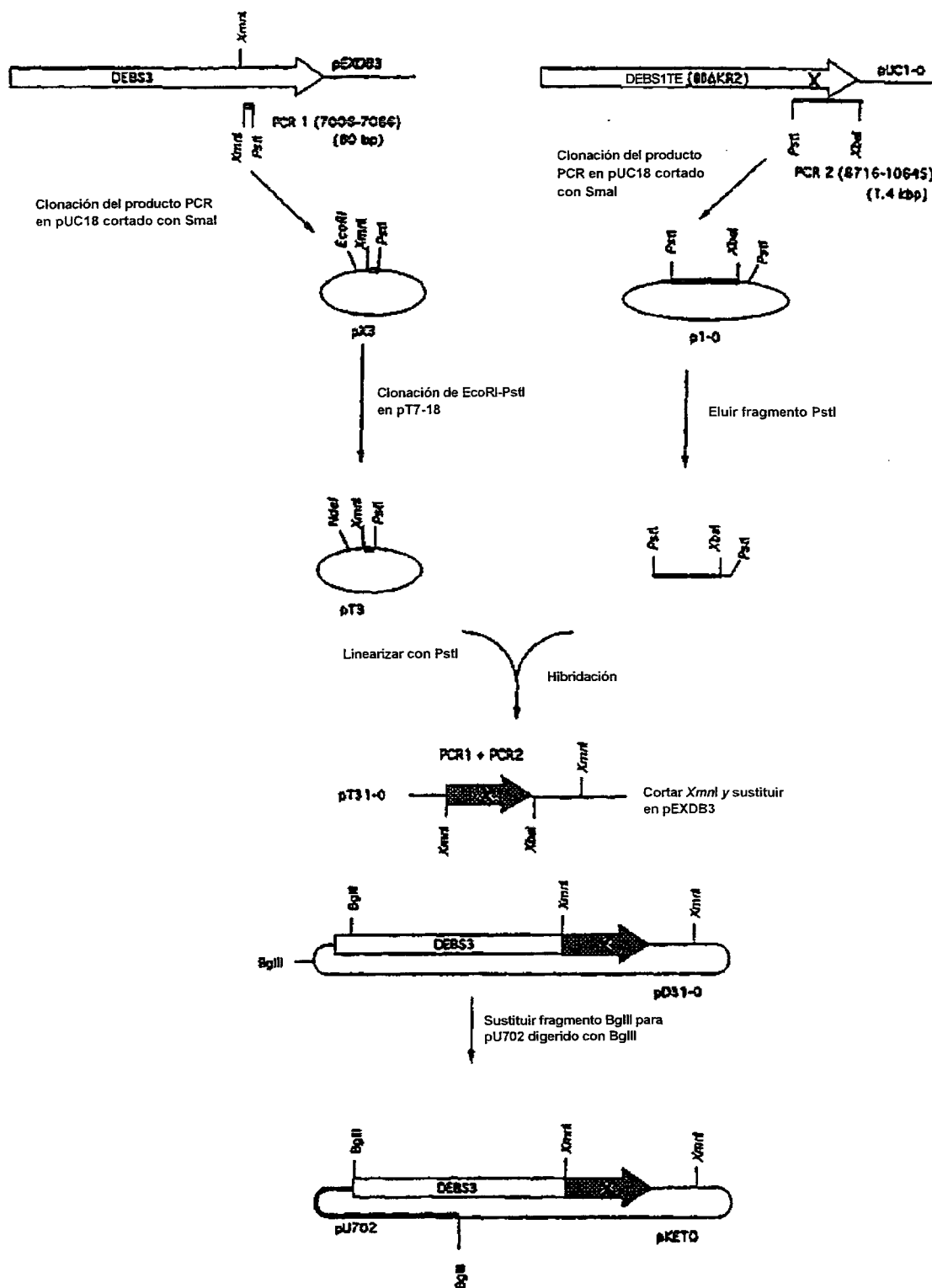


Fig 23. Construcción del plásmido pKETO

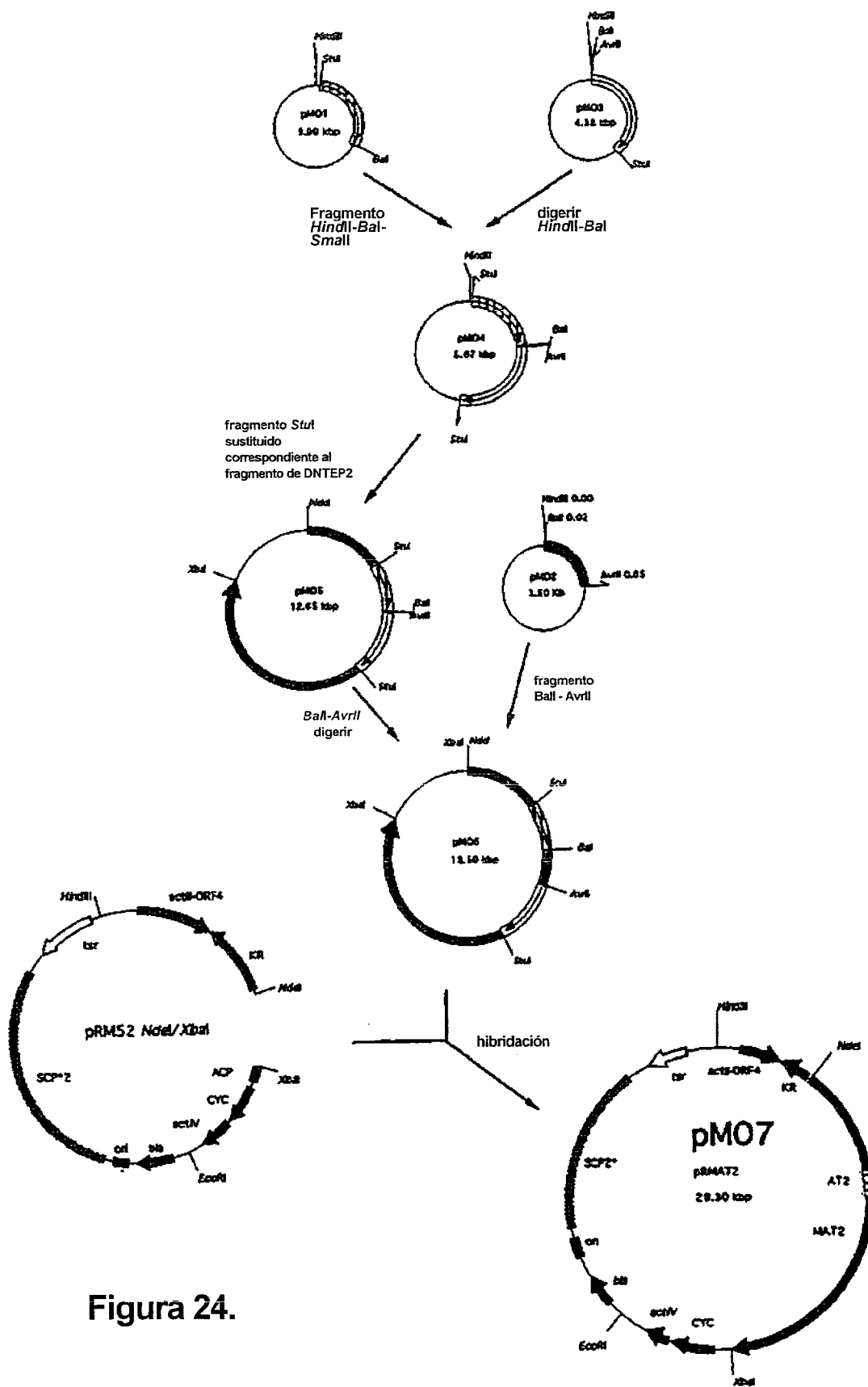


Figura 24.

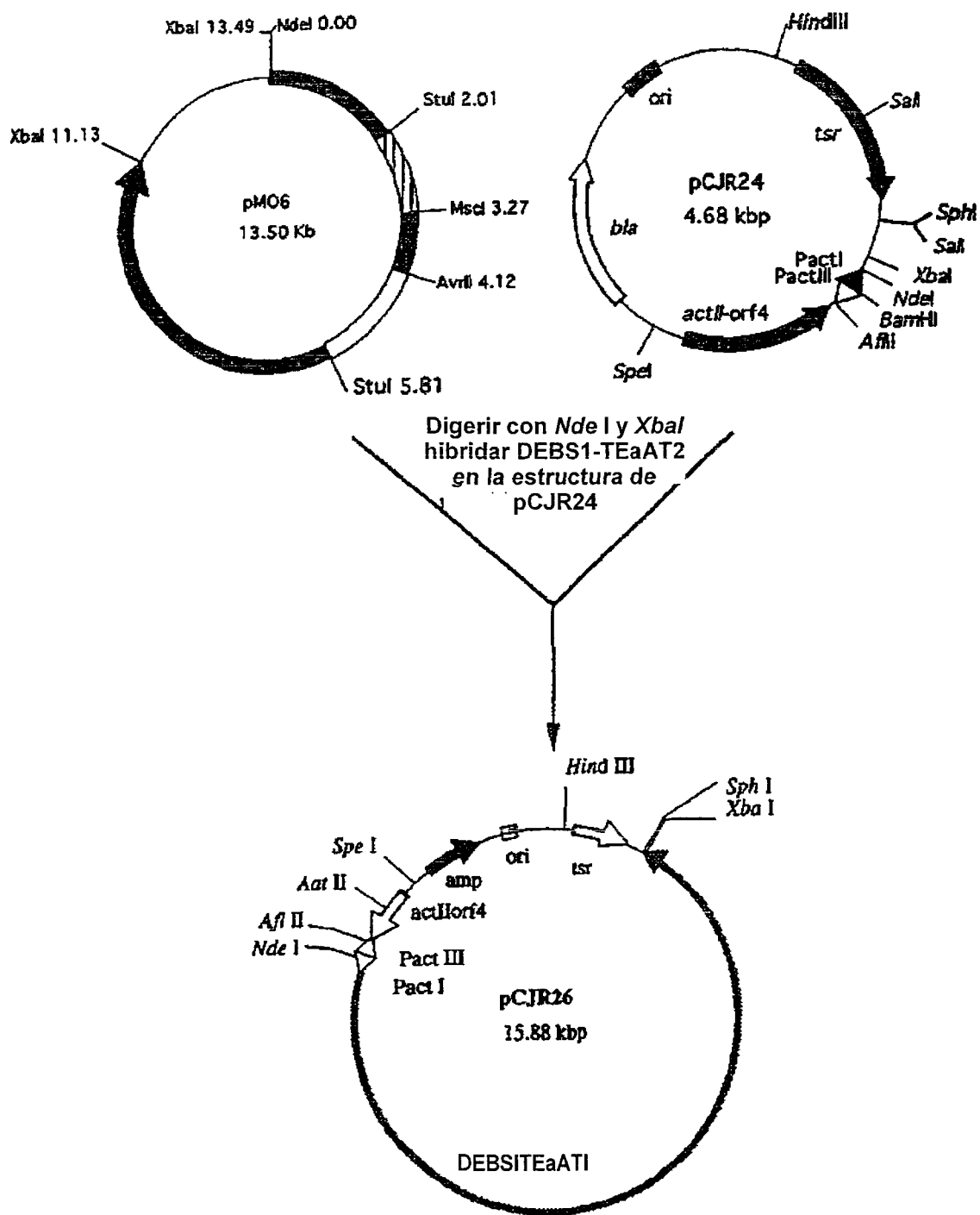


Figura 25

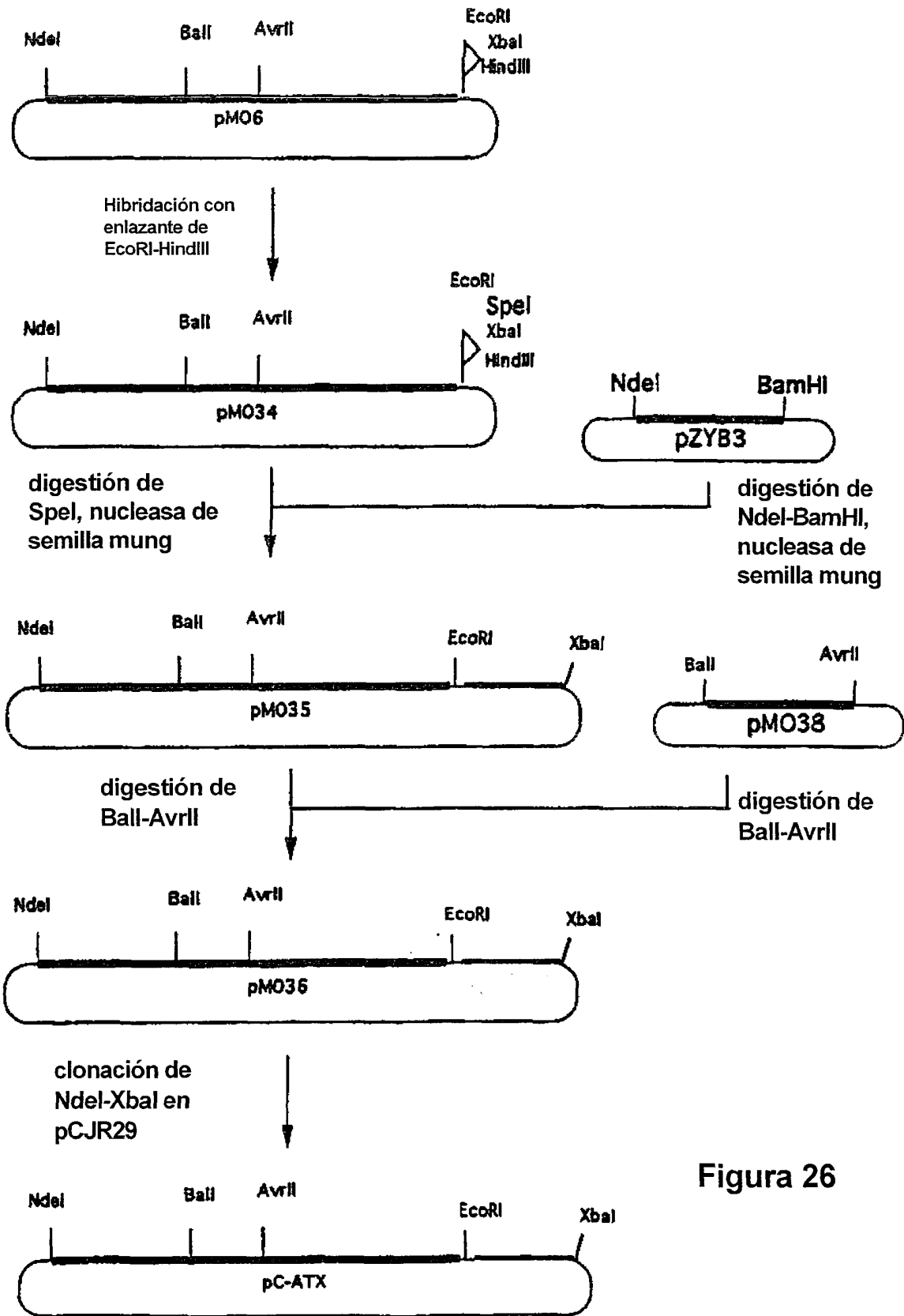


Figura 26

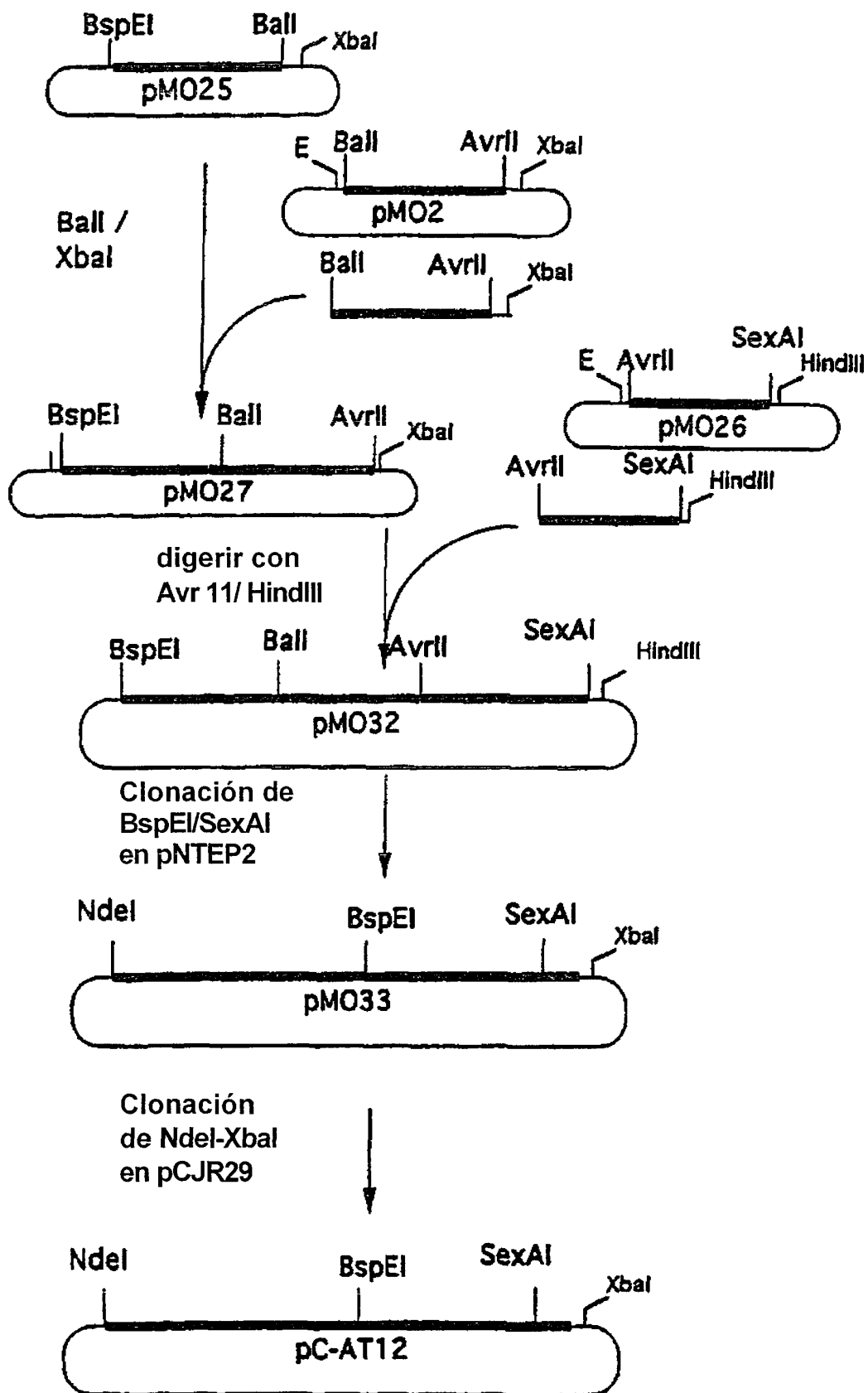


Figura 27

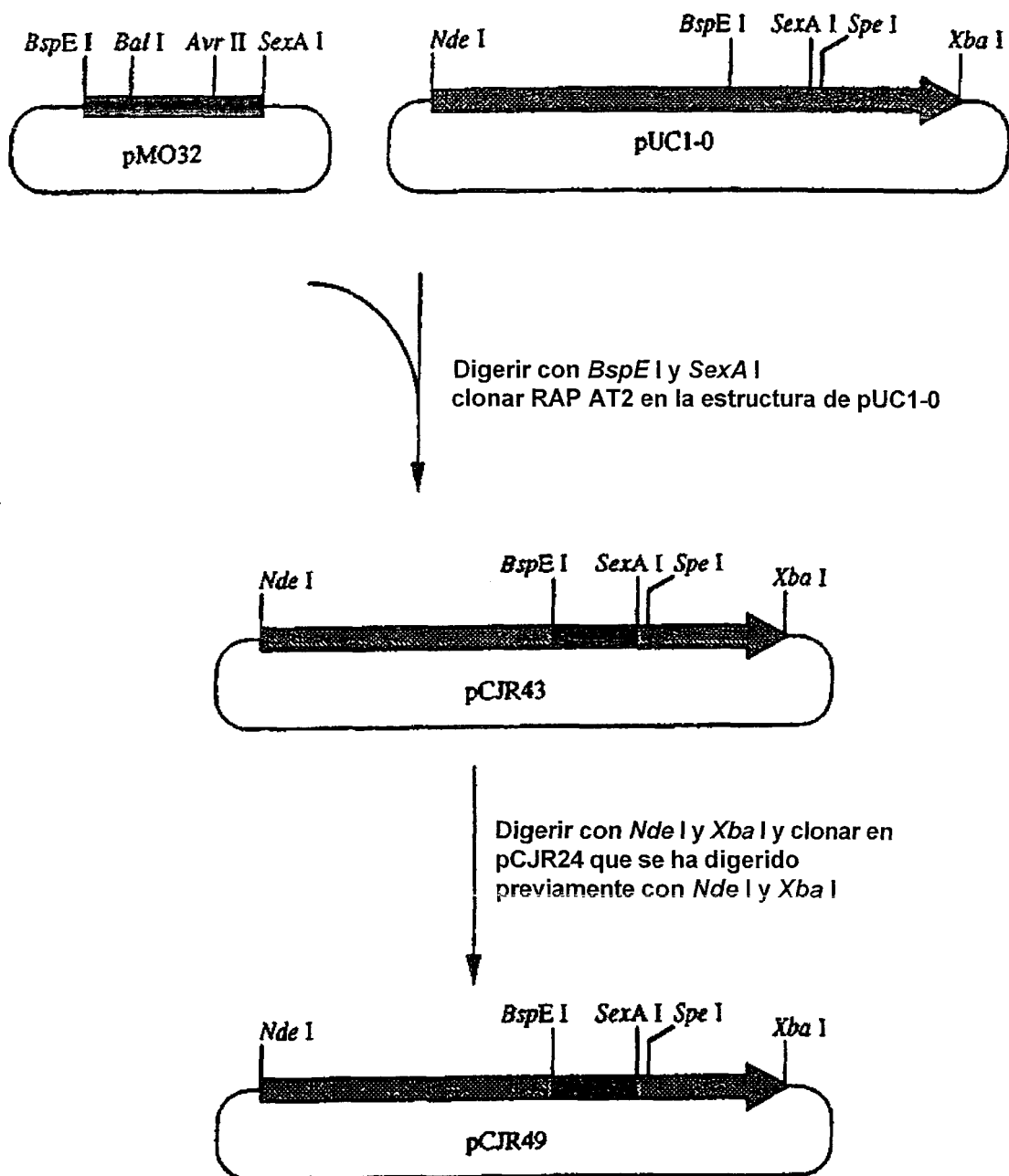


Figura 28

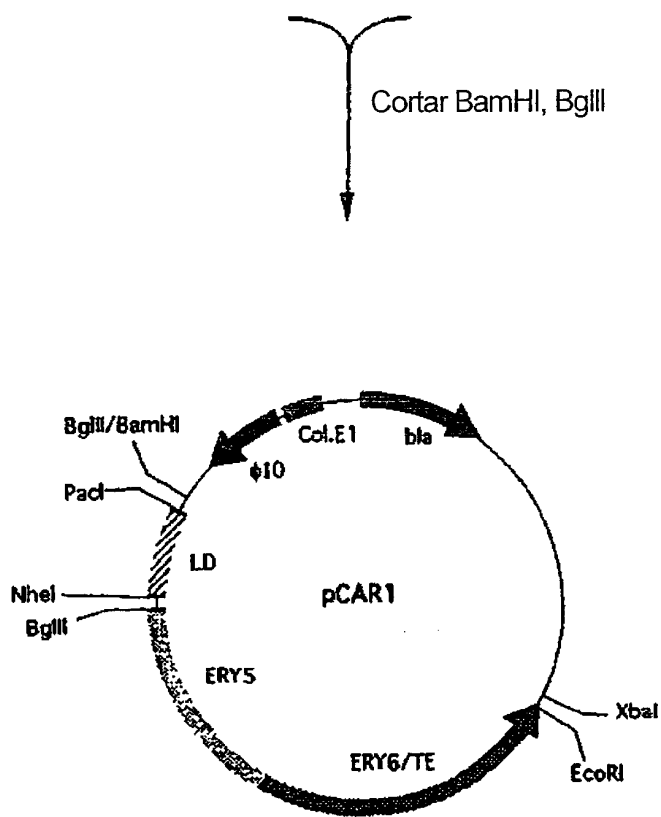
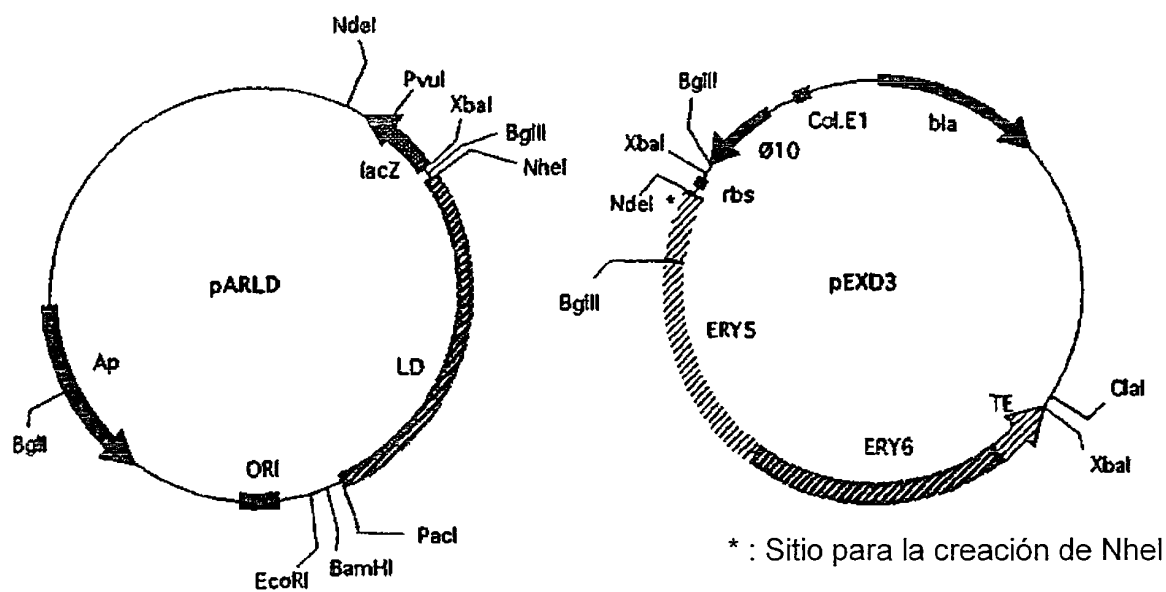


Figura 29a: Construcción de pCART11

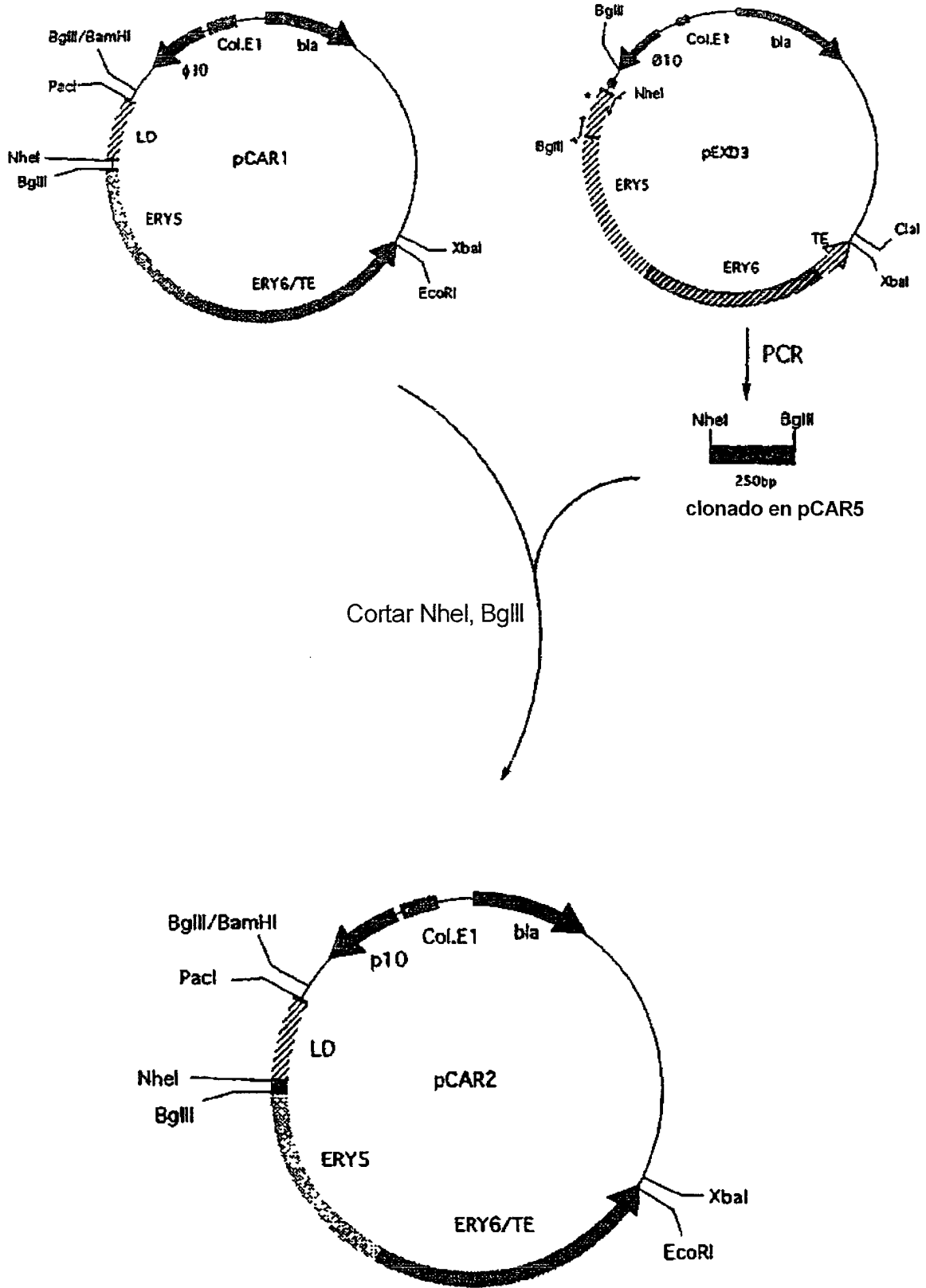


Figura 29b: Construcción de pCART11

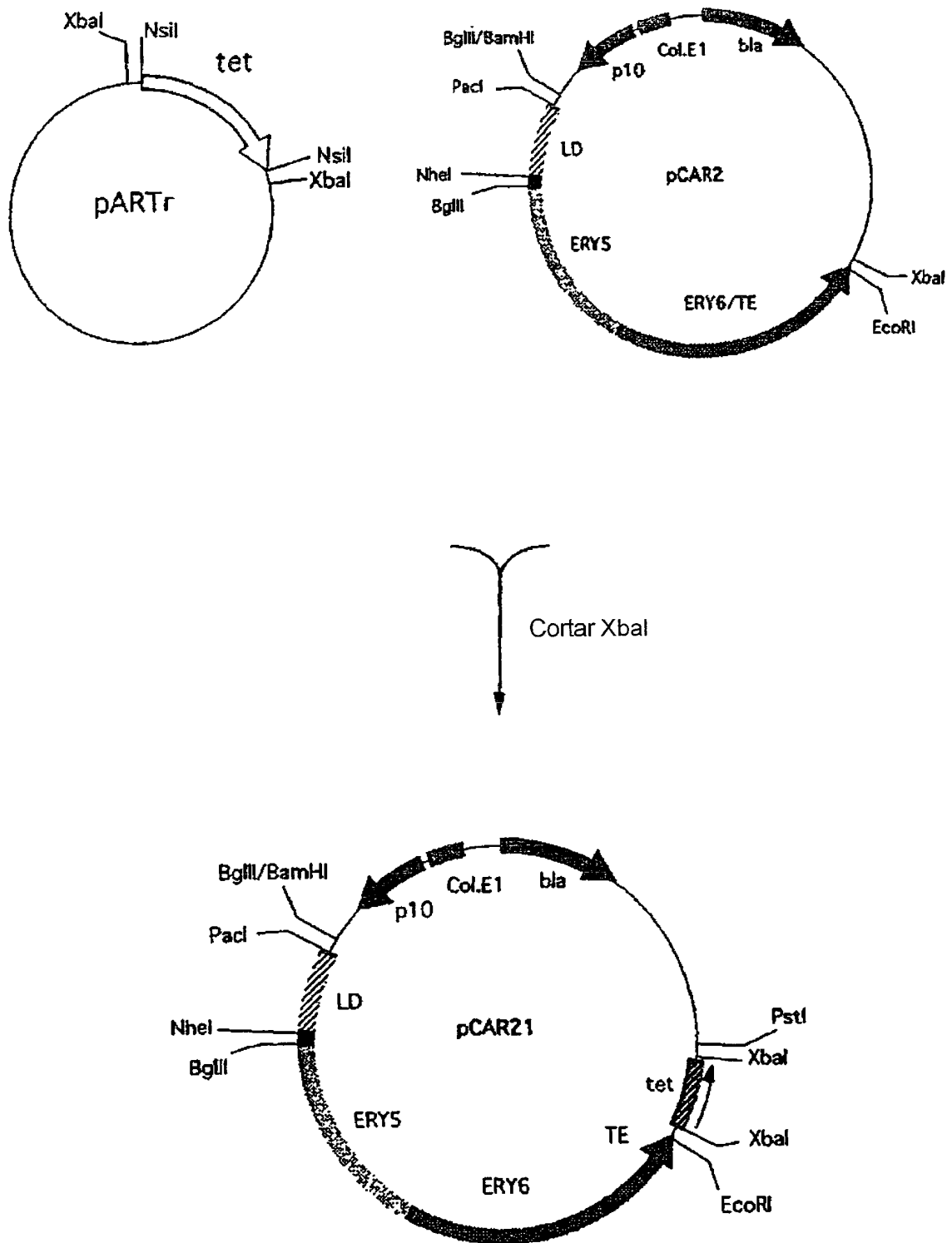


Figura 29c: Construcción de pCART11

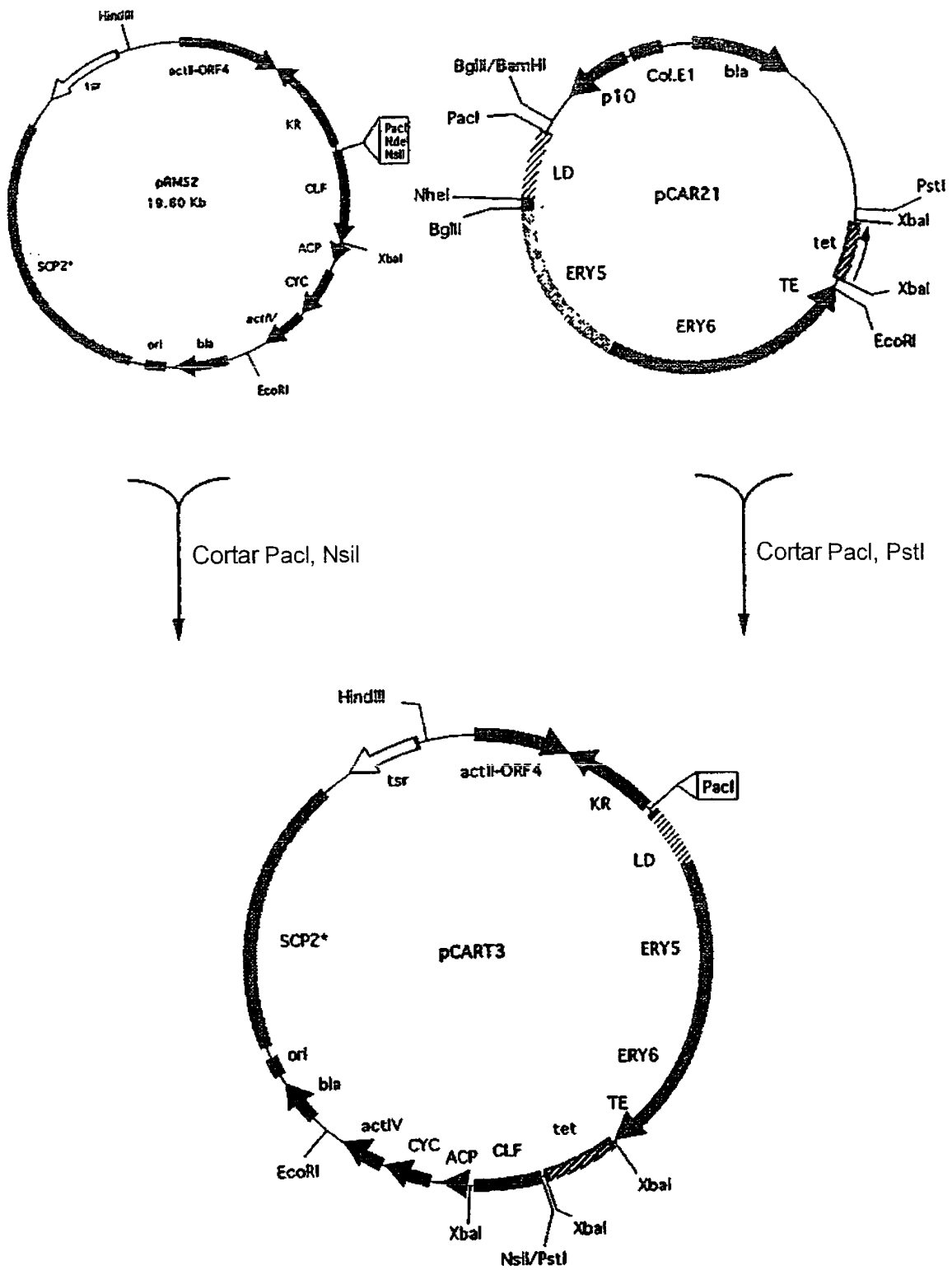


Figura 29d: Construcción de pCART11

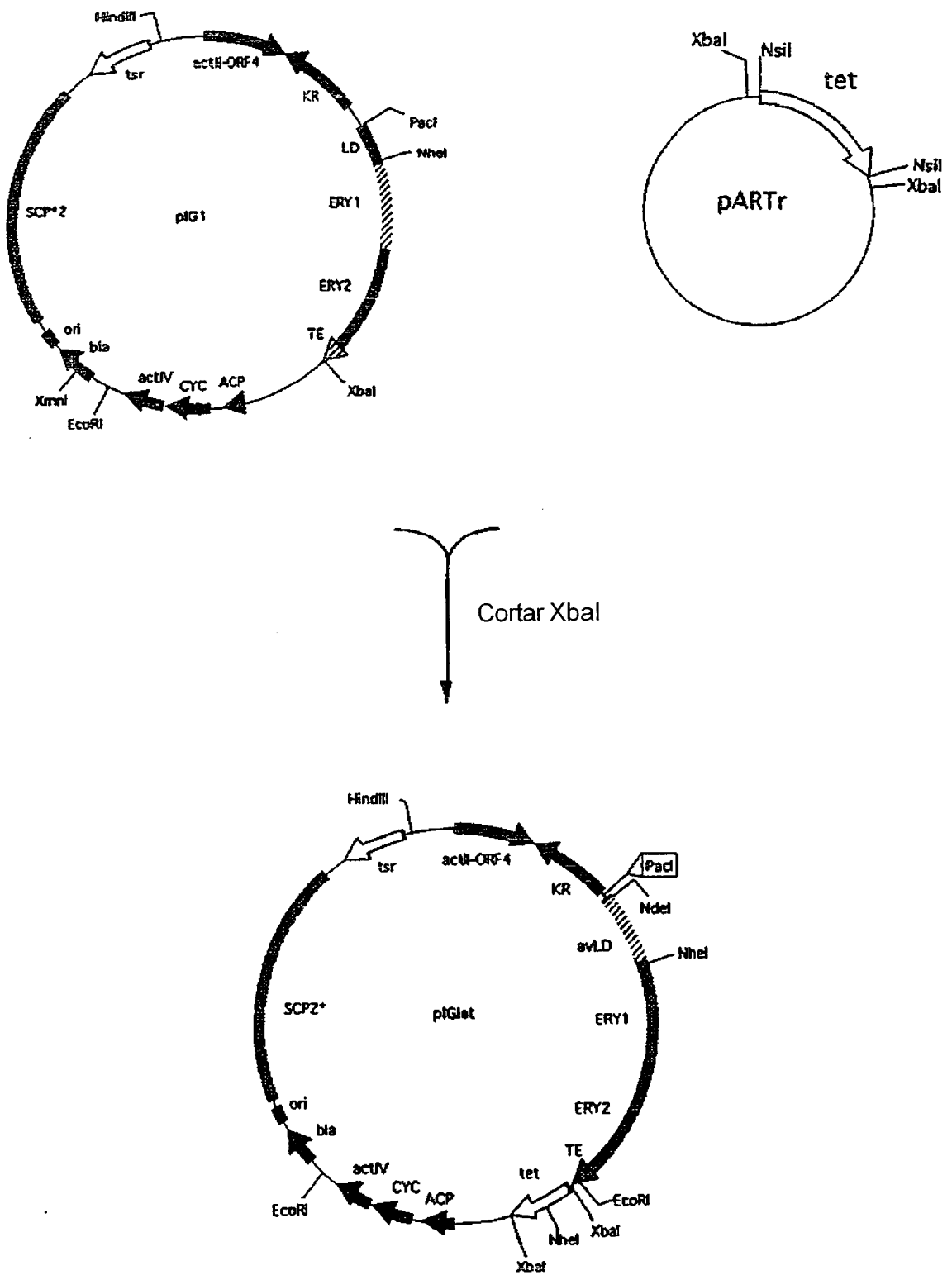


Figura 29e: Construcción de pCART11

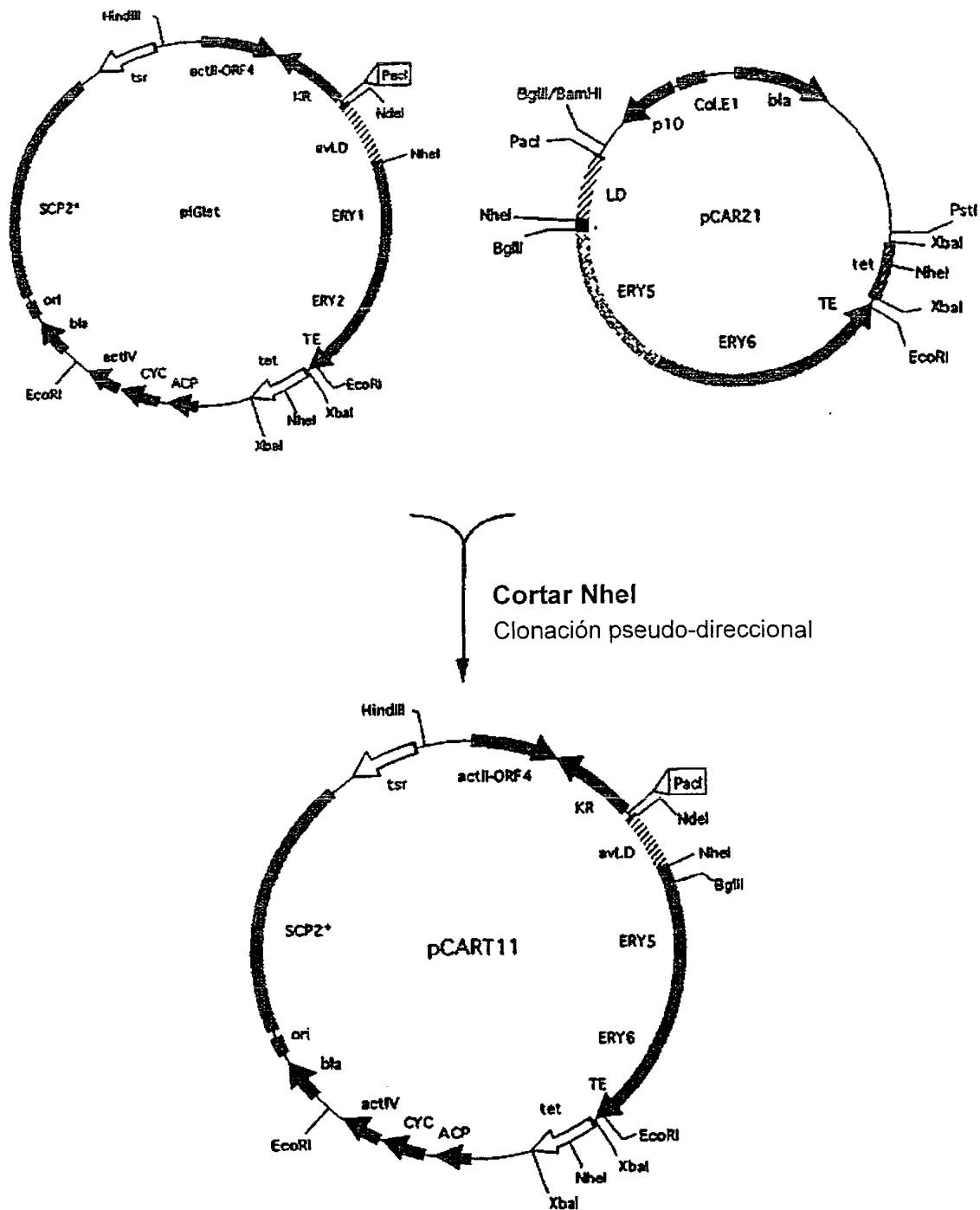


Figura 29f: Construcción de pCART11

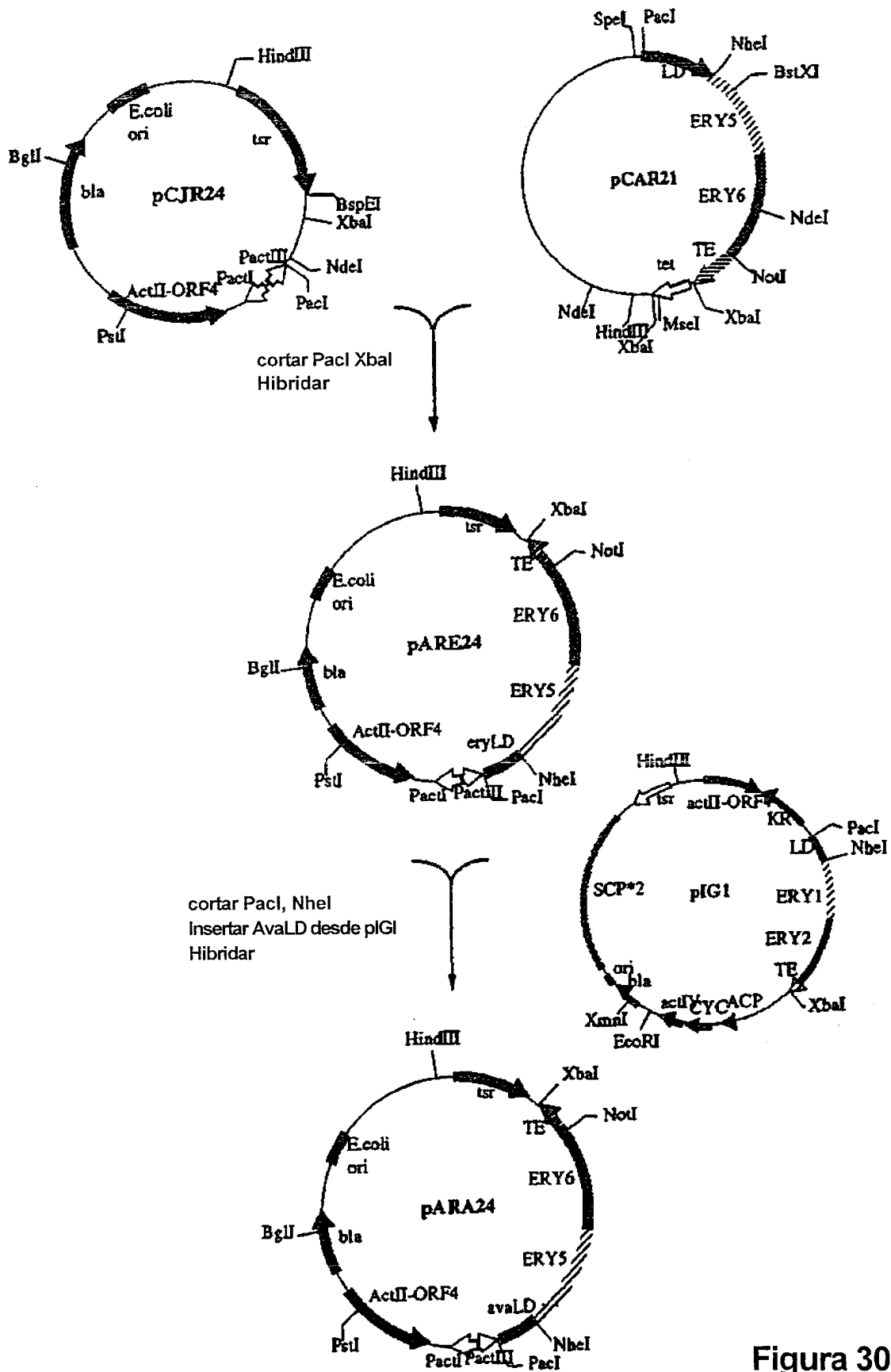


Figura 30

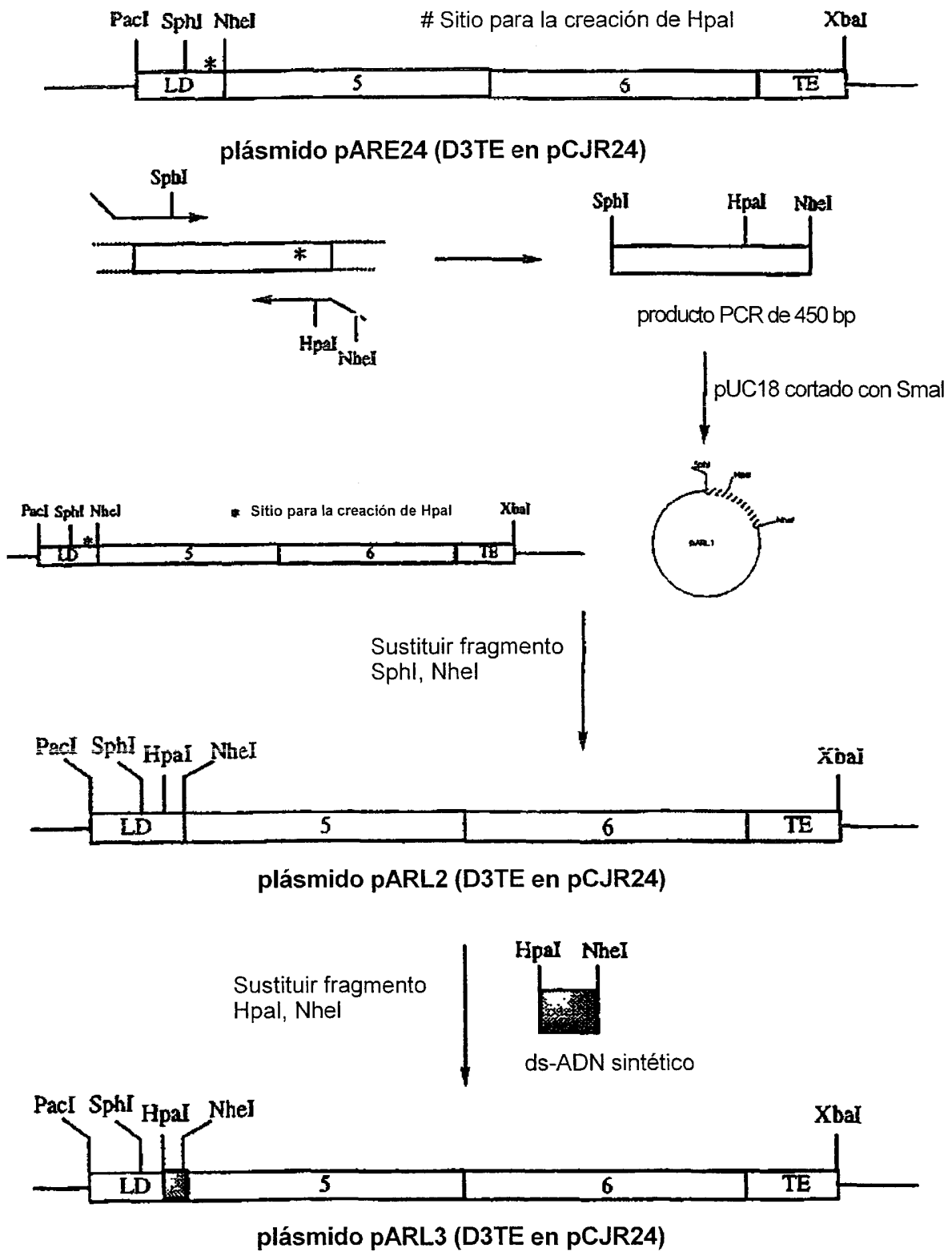


Figura 31: Construcción de plásmido pARL3

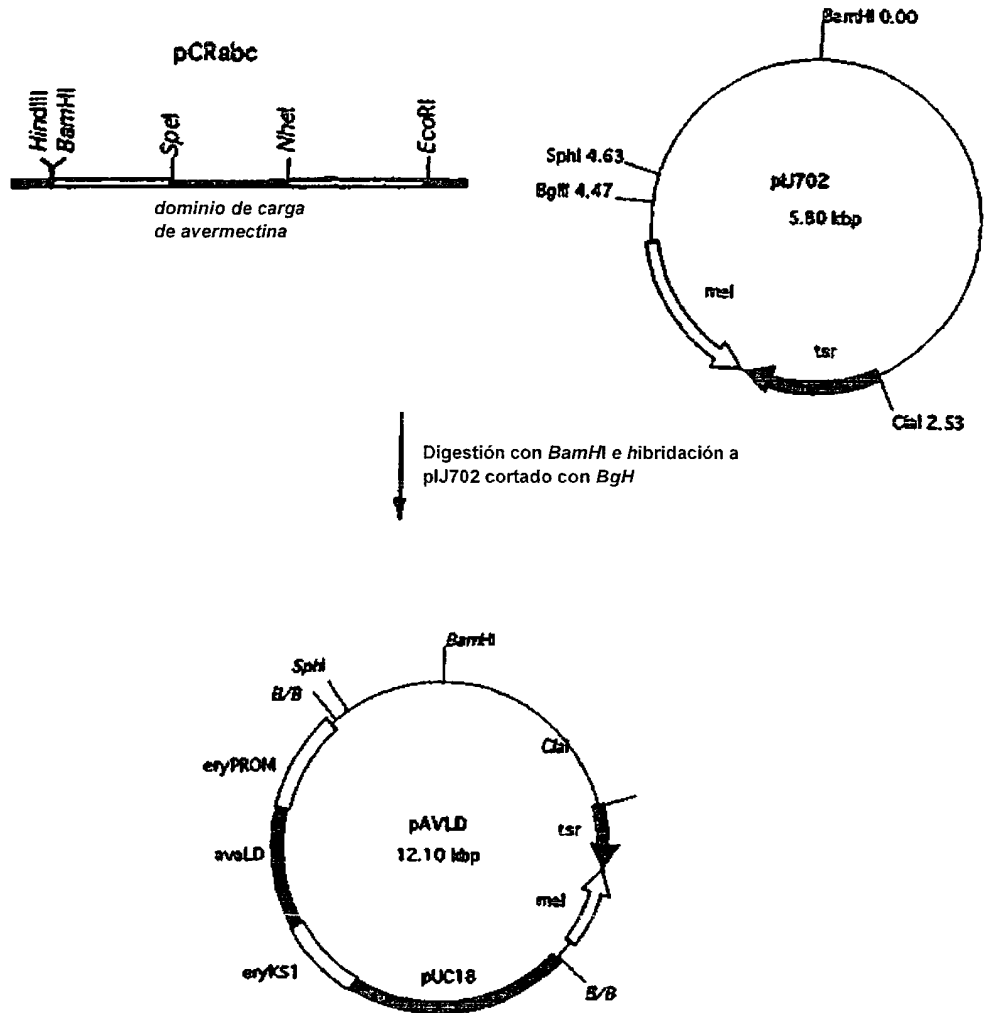


Figura 32.